

# **Funktionelle Charakterisierung des Hrd1-Proteins – einer Komponente der HRD-Ubiquitinligase**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

D o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M. Sc. Susanne Fichtner (geb. Kreßner)

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. –Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Thomas Sommer
2. Prof. Dr. Oliver Daumke
3. Prof. Dr. Janine Kirstein

Datum der Einreichung: 01.04.2019

Datum der Promotion: 22.05.2019



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>ii</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Proteinqualitätskontrolle der Zelle .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Das 26S Proteasom und Cdc48 .....	3
<b>1.3 Proteinqualitätskontrolle des endoplasmatischen Retikulums .....</b>	<b>5</b>
1.3.1 Endoplasmatisches Retikulum-assoziiierter Proteinabbau (ERAD) .....	5
<b>1.4 Die HRD-Ubiquitin-Ligase.....</b>	<b>6</b>
<b>1.5 Der Export von ERAD-Substraten aus dem ER .....</b>	<b>9</b>
1.5.1 Beteiligung von Sec61, Der1 und Hrd1 an der Dislokation.....	10
1.5.2 Proteinimport peroxisomaler Proteine – eine mögliche Analogie .....	12
<b>1.6 Zelluläre Stressreaktion und „The unfolded protein response“ .....</b>	<b>13</b>
<b>1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....</b>	<b>14</b>
<b>2 Ergebnisse.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Die Bedeutung der Transmembranregion von Hrd1 für den Abbau von ERAD-Substraten.....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Identifizierung von Hrd1-Varianten mit einem reduzierten Abbauvermögen von ERAD-L Substraten.....	15
2.1.2 Die genomische Integration der Hrd1-Konstrukte führt zu deutlicheren Unterschieden im Substratabbau durch die Hrd1-Varianten.....	18
2.1.3 Hrd1 <sub>E84L, H101L</sub> zeigt einen spezifischen Abbaufekt für luminale ERAD-Substrate.....	18
2.1.4 Die Stresstoleranz von Hrd1 <sub>E84L, H101L</sub> -produzierenden Zellen ist leicht vermindert .....	21
2.1.5 Hrd1 <sub>E84L, H101L</sub> ist korrekt mit der HRD-Ligase assembliert .....	23
2.1.6 Hrd1 <sub>E84L, H101L</sub> bildet Dimere .....	25
2.1.7 Einfluss von Hrd1 <sub>E84L, H101L</sub> auf die Ausbildung eines Dislokationskanals .....	26
2.1.8 Hrd1 <sub>E84L, H101L</sub> zeigt eine verminderte Tendenz zur Ausbildung höher-molekularer HRD-Ligase-Komplexe.....	29

---

2.1.9	Die räumliche Anordnung zwischen Hrd1 <sub>E84L, H101L</sub> und Der1 ist verändert ....	31
<b>2.2</b>	<b>Charakterisierung der Transmembranregion von Hrd1 mittels zielgerichtetem <i>in vivo photo-crosslinking</i>.....</b>	<b>32</b>
2.2.1	Zielgerichteter Einbau des <i>Crosslinkers</i> <i>p</i> -Benzoyl-L-Phenylalanin (pBPA) in ausgewählte Positionen von Hrd1 .....	32
2.2.2	Produktion und Stabilität der mit pBPA-markierten Hrd1-Varianten .....	34
2.2.3	Assoziation der pBPA-markierten Hrd1-Varianten mit der HRD-Ligase .....	38
2.2.4	Zusammenstellung der <i>crosslinking</i> Ergebnisse und Funktionalität des <i>crosslinking</i> Experiments .....	39
2.2.5	Die erste luminal Schleife von Hrd1 bildet Quervernetzungen zur luminalen Domäne von Hrd3 und Hrd3 <sub>KR</sub> aus .....	41
2.2.6	Quervernetzungen zwischen Hrd1 und dem ERAD-Substrat CPY* innerhalb der Membranregion lassen sich nicht eindeutig darstellen .....	42
<b>2.3</b>	<b>Weiterführende Charakterisierung des Mechanismus zur Regulation der Hrd1 Stabilität .....</b>	<b>46</b>
2.3.1	Die Stabilität von Hrd1 wird durch Hrd3 und Usa1 beeinflusst .....	46
2.3.2	Das E2-Enzym Ubc4 ist am Abbau von Hrd1 beteiligt.....	48
2.3.3	Einfluss von Usa1-Phosphorylierungen auf die Stabilität von Hrd1 .....	50
2.3.4	Der Abbau von Hrd1 kann durch ein Serin innerhalb der UBL-Domäne von Usa1 beeinflusst werden.....	52
<b>3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>56</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der Transmembranregion von Hrd1.....</b>	<b>56</b>
3.1.1	Veränderungen der dritten Membranhelix von Hrd1 beeinflussen den Abbau luminaler ERAD-Substrate.....	56
3.1.2	Die Rekrutierung der Ligasekomponenten durch Hrd1 <sub>E84L, H101L</sub> ist unverändert .....	57
3.1.3	Substitutionen von E84 und H101 von Hrd1 stören die korrekte sterische Ausrichtung der HRD-Ligase in der Membran .....	57
3.1.4	Hrd1 ist an der Translokation beteiligt .....	58
3.1.5	Ein Modell für die Rolle von Hrd1 bei der Dislokation von Substraten.....	61
<b>3.2</b>	<b>Hinweise für eine posttranslationale Regulation von Hrd1 .....</b>	<b>62</b>
3.2.1	Ubc4 ist am Abbau von Hrd1 beteiligt.....	62
3.2.2	Der Abbau von Hrd1 wird durch eine UBL-Domäne beeinflusst.....	63



---

3.2.3	Ein Modell zum Einfluss der Usa1UBL-Domäne auf die Hrd1-Stabilität .....	65
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>66</b>
4.1.1	Antikörper .....	66
4.1.2	Chemikalien .....	67
4.1.3	Enzyme .....	67
4.1.4	Größenstandards .....	67
4.1.5	Geräte und sonstige Materialien .....	67
4.1.6	Hefestämme .....	68
4.1.7	Kommerzielle Reaktions- und Nachweissysteme .....	68
4.1.8	Medien .....	68
4.1.9	Plasmide .....	69
4.1.10	Puffer und verschiedene Lösungen .....	69
4.1.11	Oligonukleotide .....	71
<b>4.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>71</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>71</b>
4.2.1.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	71
4.2.1.2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	71
4.2.1.3	DNA-Sequenzierung .....	72
4.2.1.4	Präparation von genomischer DNA aus Hefen .....	72
4.2.1.5	Polymerasekettenreaktionen (PCR) .....	72
4.2.1.6	Gerichtete Punktmutagenese von Plasmid-DNA .....	72
4.2.1.7	Restriktionsverdau von DNA .....	72
4.2.1.8	DNA-Transformation in <i>E. coli</i> .....	73
4.2.1.9	DNA-Transformation in Hefe .....	73
4.2.1.10	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	73
4.2.1.11	Modifikationen der genomischen DNA von Hefezellen .....	74
4.2.1.12	Kolonie-PCR für Hefe .....	74
<b>4.2.2</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>76</b>

---

4.2.2.1	Gesamtzellaufschluss von Hefezellen.....	76
4.2.2.2	Isolierung der Membranfraktion aus Hefezellen.....	76
4.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ( <i>SDS-PAGE</i> ).....	76
4.2.2.4	Immunoblot ( <i>Western Blotting</i> ).....	76
4.2.2.5	Coomassie-Färbung.....	77
4.2.2.6	Amidoschwarzfärbung.....	77
4.2.2.7	Immunopräzipitation unter nativen Bedingungen (Ko-IP).....	77
4.2.2.8	Aufreinigung von Proteinen für die massenspektrometrische Analyse ...	78
4.2.2.9	Massenspektrometrischer Nachweis der Usa1-Phosphorylierungen.....	78
4.2.2.10	Isolierung von RNA aus Hefe .....	79
4.2.2.11	cDNA Synthese aus RNA (reverse Transkription) .....	80
<b>4.2.3</b>	<b>Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>80</b>
4.2.3.1	Kultivierung der Hefezellen .....	80
4.2.3.2	Messung der optischen Dichte von Zellkulturen.....	80
4.2.3.3	Einfügen genetischer Veränderungen durch homologe Rekombination (Sporulation und Tetradendisektion von Hefezellen).....	81
4.2.3.4	Platten-Wachstumstest für Hefezellen .....	81
4.2.3.5	Farbtest zum Nachweis der vakuolären Peptidase CPY.....	82
4.2.3.6	Cycloheximid-Abbauexperiment.....	82
4.2.3.7	<i>Pulse-Chase</i> -Experiment .....	83
4.2.3.8	Zielgerichtetes <i>in vivo photo-crosslinking</i> .....	83
4.2.3.9	Unspezifisches chemisches <i>crosslinking in vivo</i> .....	84
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>85</b>
	<b>Anhang A Hefen, Plasmide, Oligonukleotide .....</b>	<b>93</b>
	<b>Anhang B PCR-Programme und Ansätze .....</b>	<b>104</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>106</b>
	<b>Präsentationen und Konferenzen.....</b>	<b>108</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>109</b>
	<b><i>Curriculum Vitae</i> .....</b>	<b>110</b>

---

<b>Danksagung.....</b>	<b>112</b>
------------------------	------------



---

# Zusammenfassung

In Eukaryoten werden sekretorische Proteine an zytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, wo sie ihre biologisch aktive Struktur erhalten. Defekte Proteine, die durch Fehler in diesem Reifungsprozess entstehen, werden über einen unbekannten Mechanismus in das Zytoplasma zurücktransportiert und durch das Ubiquitin-Proteasom System abgebaut. Dieser Qualitätskontrollweg wird „ER-assoziierte Protein Degradation“ (ERAD) genannt. Eine zentrale Komponente dieses Abbauweges ist die HRD-Ligase, ein evolutionär konservierter, membranständiger Proteinkomplex, der das E3-Enzym Hrd1 enthält. Neben einer so genannten RING-Finger Domäne, die an der Ubiquitinierung von Substratmolekülen mitwirkt, weist Hrd1 auch einen Membran durchspannenden Bereich auf. Einige publizierte Arbeiten lassen eine Beteiligung dieser Transmembrandomäne an einem neuartigen Transportsystem für den Export von fehlgefalteten Proteinen aus dem ER vermuten, aber ein direkter Nachweis für eine solche Funktion konnte bisher nicht erbracht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die Bedeutung der Transmembranregion von Hrd1 für den Abbau von ERAD-Substraten in dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen werden. Die Substitution von zwei Aminosäuren in der dritten Transmembranhelix von Hrd1 (Hrd1<sup>E84L, H101L</sup>) hemmt spezifisch den Abbau von fehlgefalteten ER-luminalen Proteinen, während die Prozessierung membrangebundener Hrd1-Substrate weitestgehend unbeeinflusst blieb. Daher zeigt die Hrd1-Variante wahrscheinlich eine Störung im Transport von luminalen ERAD-Substraten durch die ER Membran. Biochemische Analysen zeigen keine starken Veränderungen bei der Zusammensetzung der HRD-Ligase durch die Hrd1-Variante. Allerdings konnte in Experimenten mit einem chemischen Quervernetzungs-Reagenz eine leichte Abweichung bei der Ausbildung höher molekularer Komplexe festgestellt werden. Darüber hinaus ließen sich bei Anwendung von zielgerichtetem *in vivo photocrosslinking* deutliche Veränderungen in der räumlichen Orientierung der Ligaseuntereinheit Der1 zu Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> beobachten. Der1 wird ausschließlich für den Abbau ER-luminaler ERAD-Substrate benötigt und ist am Export solcher Proteine aus dem ER beteiligt. Daher ist anzunehmen, dass die korrekte Ausrichtung von Der1 zu Hrd1 innerhalb der ER-Membran eine Voraussetzung für den Transport von ERAD-Substraten in das Zytoplasma ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals einen direkten Einfluss der Transmembranregion von Hrd1 auf den Abbau luminaler ERAD-Zielproteine und legen somit eine Funktion dieser Region im Dislokationsprozess nahe.

Schlagwörter:

ERAD, HRD-Ubiquitinligase, Hrd1, ERAD-L, Dislokalisierung

---

# Abstract

In eukaryotes, secretory proteins are synthesized on cytoplasmic ribosomes and transported into the endoplasmic reticulum (ER), where they obtain their biologically active structure. Defect proteins that arise from errors in this maturation process are transported via an unknown mechanism back into the cytoplasm and are degraded by the ubiquitin proteasome system. This quality control pathway is termed “ER-associated protein degradation” (ERAD). A central component of ERAD is the HRD-ligase, an evolutionary conserved, membrane-bound protein complex that contains the ubiquitin ligase Hrd1. Aside from a so-called RING-finger domain, which is engaged in the ubiquitination of substrate molecules, Hrd1 encompasses a membrane-spanning region. Some published work raised speculations on an involvement of this trans-membrane domain in a novel transport system for the export of misfolded proteins from the ER, but a direct proof for such a function was not provided, so far.

In the course of this work new insights for the importance of the transmembrane domain of Hrd1 for the degradation of ERAD substrates in the model organism *Saccharomyces cerevisiae* were obtained. The substitution of two amino acids in the third trans-membrane helix of Hrd1 (Hrd1<sub>E84L, H101L</sub>) specifically impairs the turnover of misfolded ER-luminal proteins whereas the processing of membrane-bound Hrd1 substrates remained largely unaffected. The Hrd1-variant therefore displays most likely a defect in the transport of luminal ERAD substrates through the ER membrane. No major changes in the assembly of the HRD-ligase by the Hrd1-variant were detected. Still, experiments using a chemical *crosslinking* reagent revealed subtle differences in the formation of high molecular weight complexes. Moreover, in site specific *in vivo photo-crosslinking* assays substantial changes in the spatial orientation of the ligase subunit Der1 towards Hrd1<sub>E84L, H101L</sub> were detected. Der1 is exclusively required for the degradation of ER-luminal ERAD substrates and is involved in the export of such proteins from the ER. This implies that the proper alignment of Hrd1 and Der1 within the ER membrane is a prerequisite for the transport of ERAD substrates into the cytoplasm. This work shows for the first time a direct involvement of the trans-membrane region of Hrd1 in the degradation of luminal ERAD client proteins and in consequence indicates a function of this region in the dislocation process.

Keywords:

ERAD, HRD ubiquitin ligase, ERAD-L, dislocation

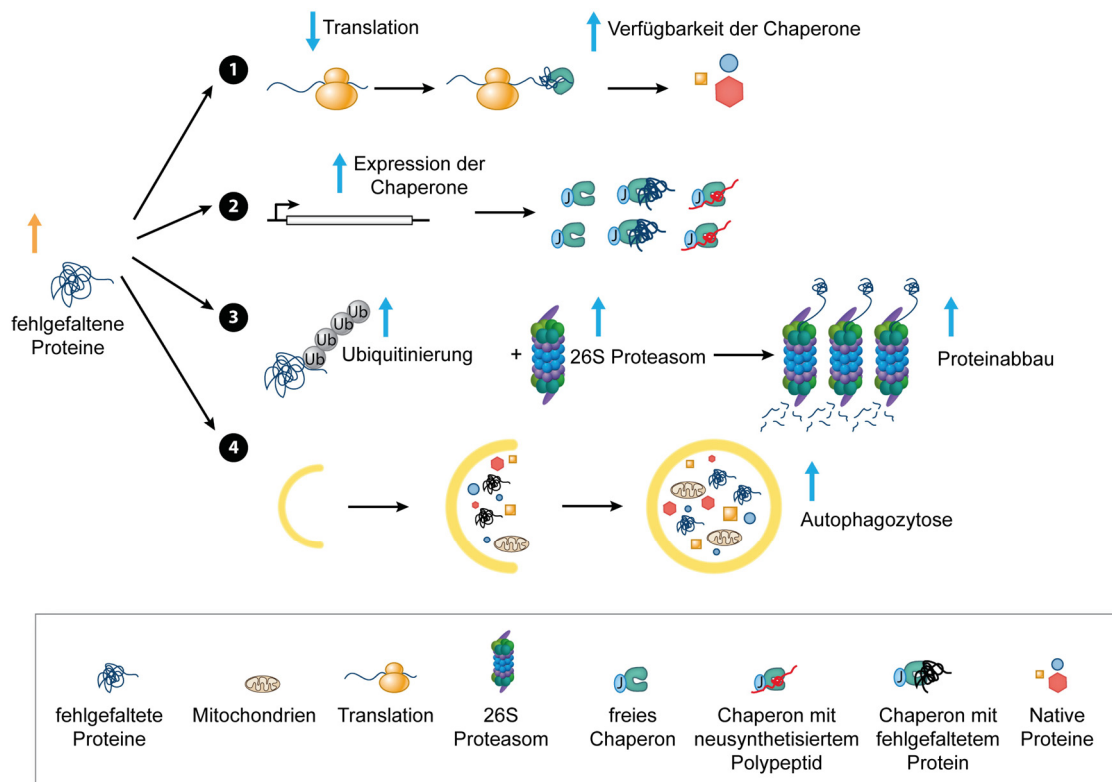
# 1 Einleitung

## 1.1 Proteinqualitätskontrolle der Zelle

Die Reifung und Faltung von Polypeptiden ist ein komplexer und fehleranfälliger Prozess, bei dem selbst bei besten Umweltbedingungen auch defekte Proteine entstehen (Balchin *et al.*, 2016). Solche fehlgefalteten Polypeptide erfüllen ihre ursprüngliche Aufgabe nicht und können enzymatische Reaktionen inhibieren oder Aggregate bilden. Verschiedenste Stressfaktoren wie Hitze, Chemikalien oder Ressourcenknappheit erhöhen die Belastung der Zelle durch fehlgefaltete Proteine. Wie wichtig es für die Zelle ist möglichst homöostatische Bedingungen hinsichtlich ihrer Proteine aufrecht zu erhalten, wird durch die Initiation von Apoptose verdeutlicht, welche das Resultat einer länger anhaltenden Akkumulation fehlgefalteter Proteine darstellen kann. Proteinefehlfaltung und -aggregation ist deshalb auch die Ursache für diverse Krankheitsbilder des Menschen, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Diabetes mellitus oder Mukoviszidose (Pilla *et al.*, 2017).

Um zelluläre Vorgänge vor den negativen Auswirkungen einer Anreicherung fehlerhafter Proteine zu schützen, haben sich eine Vielzahl von Qualitätskontrollmechanismen entwickelt. Eine wichtige Stellung nehmen hierbei die Chaperone ein, die die Faltung anderer Proteine erleichtern, eine Neufaltung missgefalteter Proteine erlauben oder diese letztendlich eliminieren indem sie diese einem gezielten Abbau zuführen (Balchin *et al.*, 2016). Für den Abbau von Proteinen gibt es in Eukaryoten im Wesentlichen zwei unterschiedliche Mechanismen: das Ubiquitin-Proteasom-System und die Autophagozytose (Pilla *et al.*, 2017). Beide Wege münden in proteolytischen Prozessen, die der Zelle das Wiederverwerten von Aminosäuren erlauben. Da viele der Qualitätskontrollmechanismen energieabhängig sind und auch die Produktion der beteiligten Komponenten einen erheblichen Stoffwechselaufwand erfordert, erfolgt eine enge Anpassung der gesamten Maschinerie durch verschiedene regulatorische Prozesse an die Bedürfnisse der Zelle. So kann bei Auftreten einer erhöhten Belastung durch missgefaltete Proteine die Kapazität der Kontrollmechanismen ebenfalls erhöht werden (**Abbildung 1-1**).

Welchen Stellenwert die Proteinqualitätsmechanismen für die Zelle einnehmen zeigt deren Konservierung von einzelligen Eukaryoten bis hin zum Menschen. Daher lassen sich viele dieser Prozesse gut in einzelligen Eukaryoten wie der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) studieren. Wie für höhere Organismen charakteristisch, lässt sich jedoch eine zunehmende Komplexität feststellen. Auch im prokaryotischen System hat sich durch konvergente Evolution ein einfaches, Ubiquitin-ähnliches System entwickelt (Delley *et al.*, 2017), welches einen proteasomalen Abbau der modifizierten Proteine erlaubt.



**Abbildung 1-1: Zelluläre Reaktionen auf eine erhöhte Belastung mit fehlgefalteten Proteinen.** 1) Eine Belastung der Zelle mit fehlgefalteten Proteinen führt unmittelbar zur Reduzierung der Translationsaktivität um die Produktion neuer Proteine zu verringern und damit die Verfügbarkeit an freien Chaperonen zu erhöhen. 2) Im Rahmen der zellulären Stressreaktion wird die Transkriptionsrate der Chaperon-kodierenden Gene gesteigert. Dadurch stehen der Zelle mehr Chaperone zur Verfügung die bei der Faltung neuer oder fehlgefalteter Proteine assistieren können. 3) Gleichzeitig wird der Proteinabbau durch verstärkte Ubiquitinierung und durch eine Erhöhung der Proteasomverfügbarkeit gesteigert. 4) Zum Abbau großer Proteinkomplexe oder ganzer Organellen werden zudem autophagozytotische Prozesse verstärkt aktiviert (modifiziert nach Pilla *et al.*, 2017).

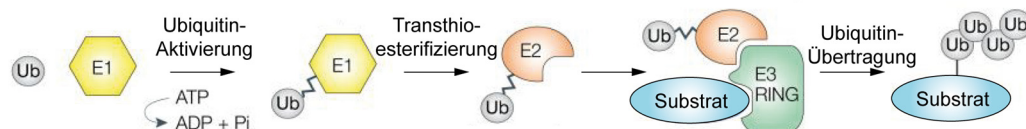
## 1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Ubiquitin ist ein 76 Aminosäuren umfassendes Protein, welches als posttranslationale Modifizierung an eine Vielzahl von Zielproteinen konjugiert werden kann. Es wurde vor rund 40 Jahren als Modifizierung von Histonproteinen entdeckt, an welche es durch eine Isopeptidbindung an Lysine gekoppelt wird (Goldknopf *et al.*, 1977). Ubiquitin kann selbst als Akzeptor für weitere Ubiquitinmoleküle dienen und dadurch sogenannte Ketten bilden. Da jedes Ubiquitinmolekül über sieben intrinsische Lysinreste und einen modifizierbaren Aminoterminus verfügt, ergeben sich verschiedene Verknüpfungsmöglichkeiten und unterschiedliche Konformationen der entstehenden Ubiquitinketten. Darüber hinaus kann Ubiquitin weitere Modifizierungen wie eine Phosphorylierung, Acetylierung oder Sumoylierung aufweisen (Swatek and Komander, 2016). Diese große Komplexität der möglichen Proteinmodifikationen durch Ubiquitin wird daher auch als Ubiquitin-Code bezeichnet. (Komander and Rape, 2012). Die Funktion bzw. der weitere Weg eines ubiquitinierten Proteins in der Zelle werden in erheblichem Maße von der Beschaffenheit seiner Ubiquitinmodifizierung bestimmt (Swatek and Komander, 2016). Beispiele für Prozesse, in denen Ubiquitin eine wichtige Rolle spielt sind die DNA-Replikation und -



Reparatur, die Genexpression, Endozytose, der Import von Substraten in Peroxisomen und der Abbau von Proteinen durch das Proteasom oder durch Autophagozytose (Finley *et al.*, 2012).

Die Modifizierung eines Proteins mit Ubiquitin ist ein energieabhängiger, mehrphasiger Prozess (Hershko *et al.*, 1983). Dabei wird das C-terminale Glycin 76 des Ubiquitins über dessen Carboxylgruppe durch eine Isopeptidbindung mit einer  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes vom Substrat kovalent verknüpft (Pickart, 2001). Diese Reaktion erfordert die Aktivität dreier sequenzieller Enzyme: E1, E2 und E3 (**Abbildung 1-2**). Während es in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* lediglich ein Ubiquitin-aktivierendes E1-Enzym gibt, sind es bereits elf Ubiquitin-konjugierende E2-Enzyme. Die größte Vielfalt erhält das System durch Substrat-spezifische E3-Enzyme. So sind in *S. cerevisiae* bereits 60 bis 100 solcher Ubiquitinligasen bekannt (Finley *et al.*, 2012). Je nach Reaktionsmechanismus werden die E3-Enzyme in verschiedene Klassen wie beispielsweise in HECT, RING oder *RING-between-RING* Ligasen eingeteilt (Finley *et al.*, 2012).



**Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Ubiquitinierungskaskade.** Ein hierarchischer Prozess unter Beteiligung von drei Enzymen ist für die Modifizierung eines Substrates mit Ubiquitin notwendig. Die Aktivierung des Ubiquitins ist eine ATP-verbrauchende Reaktion, die von einem Ubiquitin-aktivierendem E1-Enzym katalysiert wird (Ubiquitin-Aktivierung). Ubiquitin wird dabei über eine Thioesterbindung an ein Cystein im aktiven Zentrum des E1 gebunden. Von dort wird das Ubiquitin auf ein Cystein im aktiven Zentrum eines Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzyms übertragen (Transthioesterifizierung). Abschließend erfolgt die Bindung des Ubiquitins mit Hilfe eines Ubiquitin-ligierenden E3-Enzyms an eine Akzeptorgruppe eines Substrates. Dabei handelt es sich überwiegend um eine Lysinseitenkette, jedoch können auch Cysteine, Serine und Threonine modifiziert werden (modifiziert nach Lorenz, Cantor, Rape, & Kuriyan, 2013; Woelk, Sigismund, Penengo, & Polo, 2007).

### 1.2.1 Das 26S Proteasom und Cdc48

Neben der Länge einer Ubiquitinkette entscheidet die Art der Verknüpfung der einzelnen Ubiquitinreste über das weitere Schicksal eines Proteins in der Zelle. Eine der häufigsten Modifizierungen stellt eine über das Lysin 48-verknüpfte Ubiquitinkette dar. Diese führt die Substrate einem gezielten Abbau über einen multifaktoriellen, zytosolischen Proteasekomplex, dem sogenannten 26S Proteasom, zu. Das 26S Proteasom ist aus insgesamt 33 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut, die in zwei funktionalen Einheiten, der 19S regulatorischen Komponente und der 20S Kernkomponente, organisiert sind (Finley *et al.*, 2012). Die regulatorische Komponente vermittelt vor allem die Erkennung von Substraten über deren Ubiquitinmodifizierungen. Sie enthält verschiedene Adaptorproteine, allen voran Rpn10 und Rpn13, die Lysin 48-verknüpfte Ubiquitinketten und auch sogenannte „Substratshuttelfaktoren“ binden können. Einer Assoziation von Proteinen über deren Ubiquitinmodifikation können proteasomale Untereinheiten mit Deubiquitinaseaktivität entgegenwirken (Collins and Goldberg, 2017). Zusätzlich zum

Ubiquitinsignal muss jedoch noch eine wenig strukturierte Region in einem Polypeptid vorhanden sein, die die Bindung an das Proteasom unterstützt. Alles in allem entscheidet die Verweildauer eines Polypeptides am regulatorischen Komplex darüber, ob es weiter ins proteolytische Zentrum gelangt und dort abgebaut wird. Am Übergang zur 20S Kernkomponente befindet sich die sogenannte „Basis“, eine Struktur aus sechs ringförmig angeordneten AAA-ATPasen, die für die Entfaltung der Substrate und deren Transport zum Kernkomplex verantwortlich sind. Die Kernkomponente beinhaltet die proteolytisch aktiven Untereinheiten. Sie besitzen eine Caspase-ähnliche, Trypsin-ähnliche sowie Chymotrypsin-ähnliche Proteaseaktivität und zerlegen die abzubauenden Substrate in kleine Peptide bis hin zu Dipeptiden. Diese werden ins Zytosol entlassen und dort rapide von zytosolischen Proteasen in einzelne Aminosäuren zerlegt werden (Finley *et al.*, 2012; Collins and Goldberg, 2017).

Eng mit dem Ubiquitin-Proteasom-System verbunden ist die AAA-ATPase Cdc48, in Säugetieren p97 oder VCP genannt. Sie ist, jeweils mit spezifischen Kofaktoren, an unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt. So wird Cdc48 in Assoziation mit den Ubiquitin-bindenden Kofaktoren Npl4 und Ufd1 für die Extraktion ubiquitinierte Proteine aus Membranen und Proteinkomplexen benötigt, um diese dem proteasomalen Abbau zuzuführen (Bodnar and Rapoport, 2017b; Bodnar *et al.*, 2018). Cdc48 enthält neben einem N-terminalen Bereich zwei als D1 und D2 bezeichnete ATPase-Domänen. Der funktionelle Cdc48-Komplex besteht aus sechs Cdc48-Monomeren die sich zu einer ringförmigen Struktur aneinanderlagern in dessen Mitte sich eine zentrale Pore befindet. Ubiquitinierte Substrate werden über die beiden Kofaktoren Ufd1 und Npl4 rekrutiert. Um Substrate anschließend aus einer Membran oder einem Komplex herauszulösen, werden sie durch die ATPase-Aktivität der D2-Domäne schrittweise entfaltet und gleichzeitig durch die zentrale Pore gefädelt. Wie die Initiation dieser D2-vermittelten Substratentfaltung erfolgt, ist noch nicht abschließend geklärt. Für die Ablösung des Substrates scheint die ATPase-Aktivität der D1-Domäne zusammen mit einer Deubiquitinase verantwortlich zu sein. Anschließend wird das Substrat entlassen und kann aufgrund der noch vorhandenen Ubiquitinmodifizierung einem proteasomalen Abbau zugeführt werden (Bodnar and Rapoport, 2017a; Ye *et al.*, 2017). In einer anderen aktuellen Arbeit wird Cdc48 als Retrochaperon bezeichnet, um auf seine wichtige Rolle im Prozess der ER-assoziierten Proteindegradation hinzuweisen (Neal *et al.*, 2017). Demzufolge gewährleistet Cdc48 im Zytosol auch die Löslichkeit fehlgefalteter Proteine nach deren Dislokation aus dem ER.

## 1.3 Proteinqualitätskontrolle des endoplasmatischen Retikulums

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein Kompartiment zur Faltung und Reifung von Proteinen des sekretorischen Weges einer Zelle. Man schätzt, dass bis zu einem Drittel aller zellulären Proteine in diesem Kompartiment ihre biologisch aktive Struktur erreichen. Die überwiegende Mehrheit der Proteine des Sekretionsweges gelangen als ungefaltete Polypeptidketten entweder ko- oder posttranslational durch den engen Kanal des Sec61 Translokons in das ER. Im ER assistieren verschiedene Faktoren bei der Proteinfaltung und posttranslationale Modifikationen begleiten die Proteinbiogenese. Dazu gehören das Abspalten der Signalsequenz die den Import des Protein ins ER initiiert, die Ausbildung von Disulfidbrücken, Prolin *cis/trans*-Isomerisierungen sowie *N*-Glykosylierungen. Bei Letzteren handelt es sich um das kovalente Anheften komplexer Zuckermoleküle an Asparagin-Reste der Proteine (Braakman and Bulleid, 2011). Die wichtigsten Faltungshelfer im ER sind überwiegend Chaperone der Hsp70- und der Hsp90-Familie sowie die Lectin-Chaperone (McCaffrey and Braakman, 2016; Pobre *et al.*, 2018). Das häufigste Hsp70-Chaperon im ER von *S. cerevisiae* ist Kar2, in Säugetieren BiP genannt. Es erkennt die Substrate hauptsächlich über exponierte hydrophobe Bereiche innerhalb ihrer Struktur. Anders ist dies bei den Lectin-Chaperonen zu denen Calnexin und Calreticulin gehören. Sie erkennen ihre Substrate neben hydrophoben Bereichen zusätzlich an deren Zuckermodifikation. Die Zuckermodifikation eines luminalen Proteins ist auch ein Maß für seine Verweildauer im ER. Damit bietet sie einen wirkungsvollen Mechanismus, um fehlerhafte Proteine zu erkennen (McCaffrey and Braakman, 2016).

Da die komplexen Prozesse zur Proteinfaltung und -reifung fehleranfällig sind, kommt der Proteinqualitätskontrolle des ERs eine große Bedeutung zu. Die Mechanismen im ER, die zur Erkennung und zum Abbau fehlerhafter Proteine über das Ubiquitin-Proteasom System führen, werden unter dem Begriff ER-assoziierte Degradation (ERAD) zusammengefasst. Dabei werden die als fehlerhaft erkannten Proteine zurück in das Zytosol transportiert, durch membranständige Ubiquitin-Ligasen ubiquityliert und durch das 26S Proteasom abgebaut. Die Menge an ERAD-Komponenten kann durch eine als *unfolded protein response* (UPR) bezeichnete Stressantwort dynamisch angepasst werden, was die Anreicherung fehlgefalteter Proteine im ER verhindert (Hwang and Qi, 2018).

### 1.3.1 Endoplasmatisches Retikulum-assoziiierter Proteinabbau (ERAD)

Alle Schritte zur Entfernung terminal fehlgefalteter Proteine aus dem ER durch das Ubiquitin-Proteasom-System werden unter dem Begriff Endoplasmatisches Retikulum - assoziierter Proteinabbau (ERAD) zusammengefasst (**Abbildung 1-3 A**). Die Auswahl der Proteine, die dem Abbau zugeführt werden sollen, muss dabei sehr spezifisch erfolgen, um die Proteinhomöostase im ER aufrechtzuerhalten. Bei einer nur lückenhaften Erkennung würden sich fehlgefaltete Substrate im Sekretionsweg anreichern. Andererseits sollen trotz einer stringenten Selektion naszierende Polypeptidketten sowie Intermediate des Faltungsprozesses, die ähnliche Eigenschaften wie fehlgefaltete Proteine aufweisen, nicht über ERAD abgebaut werden. Für eine spezifische Erkennung der ERAD-Substrate sind daher diverse Faktoren verantwortlich. Wie bereits erwähnt bindet das Hsp70-Chaperon Kar2 an exponierte hydrophobe Bereiche von Proteinen und kann so mit potenziellen ERAD-Substraten interagieren. Die eigentliche Selektion der ERAD-Substrate erfolgt jedoch über Komponenten von membranständigen

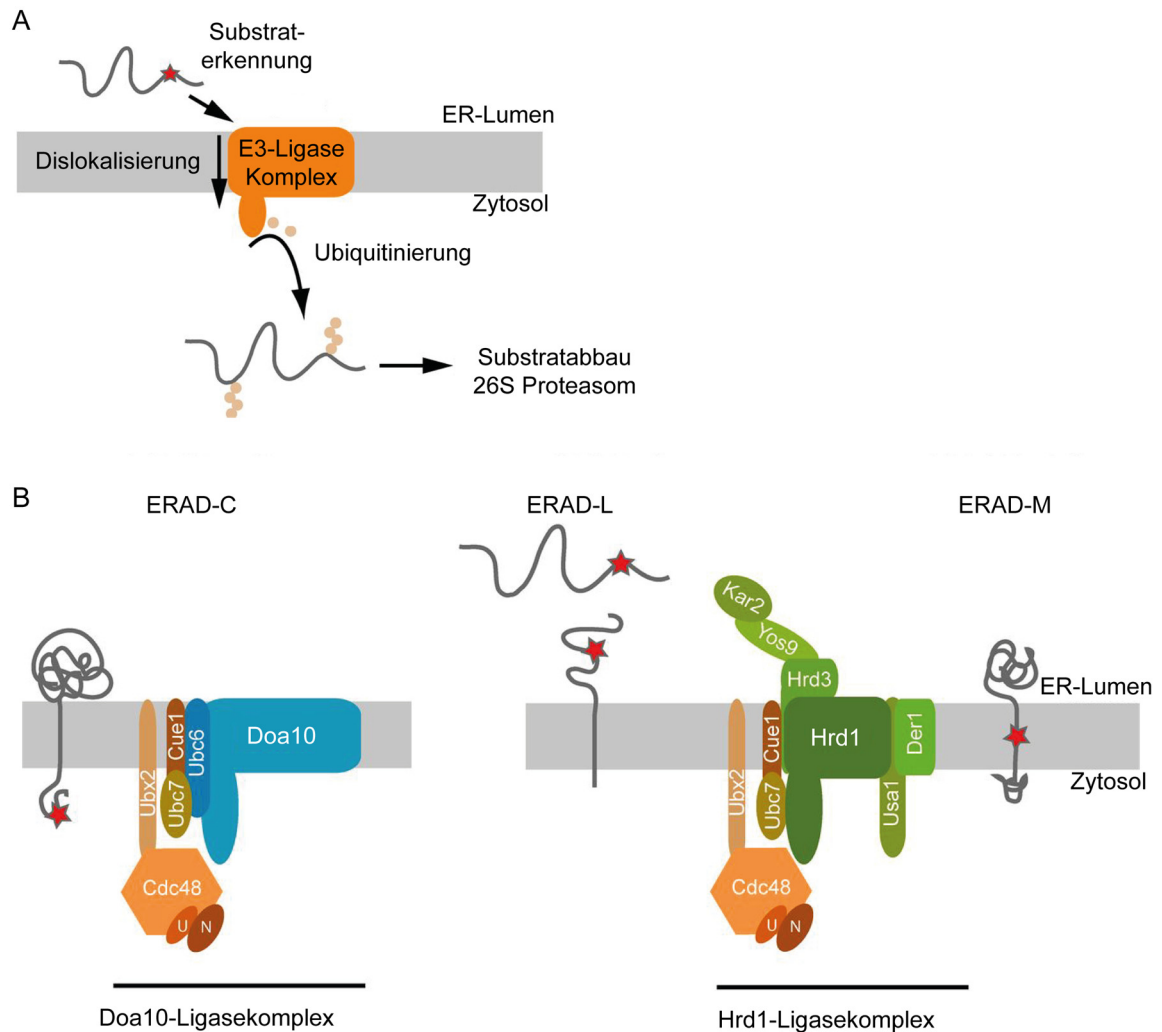
Ubiquitinligase-Komplexen. An diese können Substrate von Kar2 übergeben werden und sie initiieren einen proteasomalen Abbau der fehlgefalteten Proteine. Da die eigentliche Ubiquitinierungsreaktion auf der zytosolischen Seite der ER-Membran stattfindet, muss zunächst mindestens ein Teil des Substrates die ER-Membran passieren. Nach erfolgter Markierung der fehlgefalteten Proteine mit einer K48-verlinkten Ubiquitinkette werden diese mit Hilfe der ATPase Cdc48 ins Zytosol dislokalisiert und dem 26S Proteasom zugeführt (Ruggiano *et al.*, 2014; Wu and Rapoport, 2018). Neben dem Abbau von fehlgefalteten Proteinen werden auch einige native Enzyme metabolischer Stoffwechselwege gezielt über den ERAD-Mechanismus abgebaut, um eine posttranslationale Regulation zu ermöglichen. Dazu gehören z.B. Enzyme des Cholesterolsyntheseweges wie die HmgCoA-Reduktase (Stevenson *et al.*, 2016).

In der Bäckerhefe gibt es zwei Ubiquitinligasekomplexe, die am ERAD-Prozess beteiligt sind, die HRD-Ligase und die Doa10-Ligase. Bisher geht man von einer definierten Substratspezifität beider Ligasekomplexe aus (**Abbildung 1-3 B**). Während fehlgefaltete luminal Proteine sowie membranständige Proteine mit einer Läsion im luminalen oder membranständigen Anteil über die HRD-Ligase ubiquitiniert werden, erfolgt die Ubiquitinmarkierung membranständiger Proteine mit einer Fehlfaltung im zytosolischen Bereich über die Doa10-Ligase. Anhand der Position der Fehlfaltung gibt es eine Unterteilung der ERAD-Substrate in die drei Klassen: ERAD-L (für luminal Fehlfaltung), ERAD-M (für membran-lokalisierte Fehlfaltung) und ERAD-C (für zytosolische Fehlfaltung). Hin und wieder wird in der Literatur auch von ERAD-T gesprochen, was den Abbau von Proteinen beschreiben soll, die noch mit dem Translocon assoziiert sind. Für deren Abbau werden ebenfalls Komponenten der HRD-Ligase benötigt (Ruggiano *et al.*, 2014; Stevenson *et al.*, 2016).

## 1.4 Die HRD-Ubiquitin-Ligase

Einer der am besten charakterisierten ERAD-Abbauwege ist der über die HRD-Ligase von *S. cerevisiae*. Zu diesem Komplex gehören verschiedene ER-luminale, membranständige und zytosolische Faktoren (**Abbildung 1-4**, Mehnert, Sommer, & Jarosch, 2010). An der Substratrekrutierung im ER sind die Proteine Hrd3 und Yos9 beteiligt. Hrd1 ist das zentrale E3-Enzym des Komplexes. Der1 ist im Abbau ER-luminaler Substrate involviert und wird von dem Gerüstprotein Usa1 rekrutiert. Usa1 bindet gleichzeitig Hrd1 und besitzt zudem eine Dimerisierungsdomäne. Für eine aktive Ligase wird außerdem das E2-Enzym Ubc7 benötigt. Es wird über Cue1 an die ER-Membran lokalisiert. Für den nachgeschalteten Schritt der Substratextraktion aus der ER-Membran gelangt zudem Cdc48 über Ubx2 zur HRD-Ligase.

Die Selektion der Substrate im ER, vor allem die Unterscheidung zwischen terminal fehlgefalteten Proteinen und Faltungsintermediaten ist noch nicht vollständig verstanden. Besonders gut untersucht ist die Erkennung luminaler Glykoproteine. Bei ihrer Translokation ins ER werden viele sekretorische Proteine mit komplexen, verzweigten Zuckerketten modifiziert. Diese Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Struktur (Aebi *et al.*, 2010) wird anschließend während der Proteinreifung von verschiedenen Glukosidasen und der Mannosidase Msn1 weiter prozessiert (Hebert and Molinari, 2012). Dabei werden schrittweise endständige Glukose- und Mannose-Reste entfernt.



**Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der ER-assoziierten Proteindegradation (ERAD) sowie der involvierten Ubiquitinligasekomplexe der Bäckerhefe.** A) Der Prozess zum Abbau von ERAD-Substraten gliedert sich in mehrere Schritte. Zunächst müssen fehlgefaltete Proteine im ER erkannt werden und zur Ligase rekrutiert werden. Dann müssen die Substrate über die ER-Membran dislokalisiert und im Zytosol ubiquitiniert werden. Nach Extraktion von der Membran erfolgt der Abbau über das 26S Proteasom. B) Fehlgefaltete Proteine werden in Abhängigkeit ihrer Läsion entweder von der Doa10-Ligase (Fehlaltung im zytosolischen Bereich) oder von der HRD-Ligase (Fehlaltung in membranständigen oder luminalen Bereichen) abgebaut. Daher unterteilt man ERAD-Substrate in die Substratklassen ERAD-C, ERAD-L und ERAD-M (Ruggiano *et al.*, 2014).

Proteine, die das ER verlassen, weisen in der Hefe in der Regel eine  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  – Struktur auf (Byrd *et al.*, 1982). Verzögert sich der Export der Proteine aufgrund von Fehlern in der Proteinfaltung wird durch die Mannosidase Htm1 in Zusammenarbeit mit der Proteindisulfidisomerase Pdi1 ein weiterer Mannoserest entfernt und somit eine Glykanmodifizierung mit einer endständigen  $\alpha$ -1,6-verknüpften Mannose generiert (Pfeiffer *et al.*, 2016). Diese Zuckerstruktur wird spezifisch von der luminalen Komponente der HRD-Ligase, Yos9, erkannt. Die Glykanprozessierung bietet einen Mechanismus mit dem terminal fehlgefaltete Glykoproteine identifiziert werden können. Indem die durch Htm1/Pdi1 katalysierte Zuckerabspaltung wahrscheinlicher wird je länger sich ein Protein im ER aufhält, werden überwiegend langsam faltende oder fehlgefaltete Proteine mit einer endständigen  $\alpha$ -1,6 verknüpften Mannose modifiziert (Xu and Ng, 2015; Pfeiffer *et al.*,

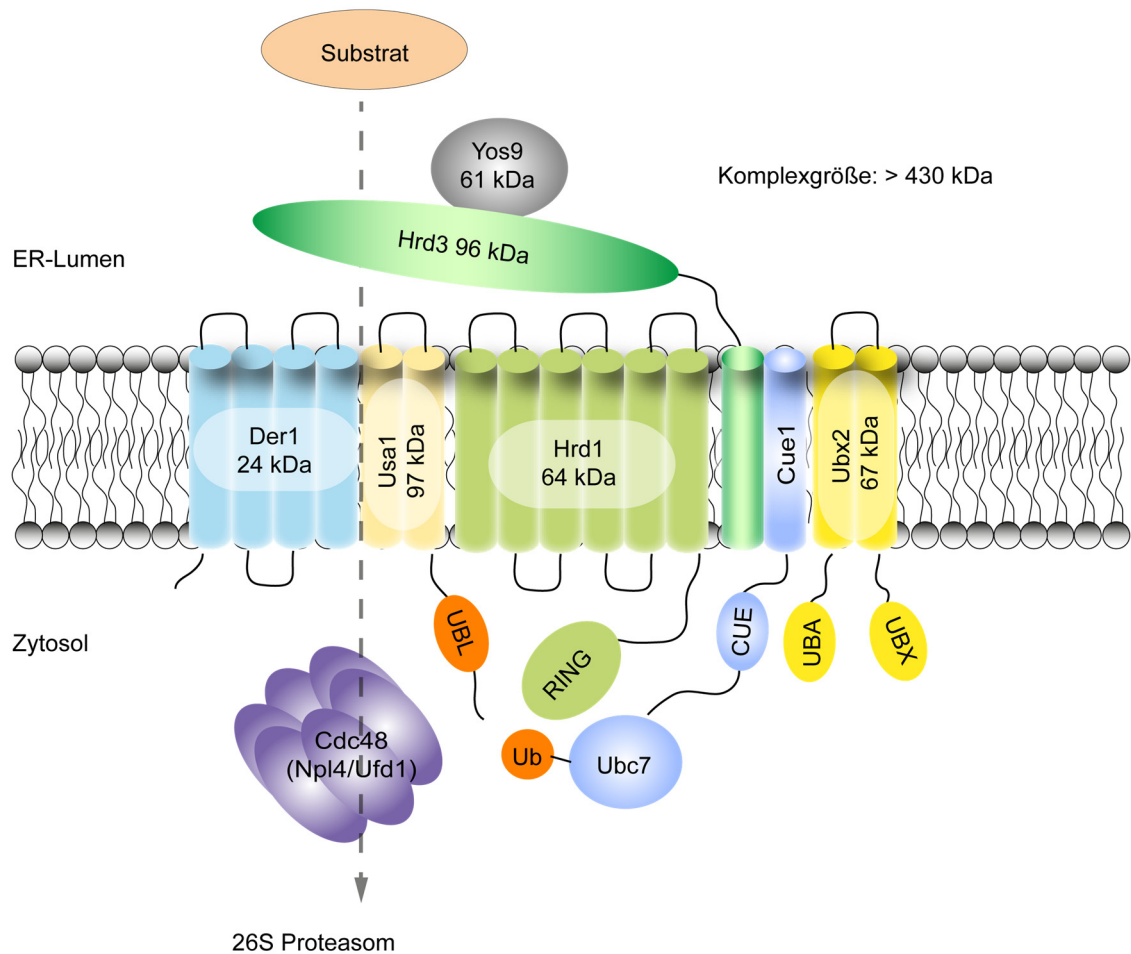
2016). Man spricht daher auch von einem *Timer Modell* der Glykanmodifizierung (Köhler, 2015). Die alleinige Bindung des Glykans an Yos9 reicht für eine Substratrekrutierung jedoch noch nicht aus. Zusätzlich muss sich die Zuckermodifikation innerhalb oder in räumlicher Nähe zu einer unstrukturierten Region des Substrates befinden. Dieser meist hydrophobe Bereich wird von Hrd3 gebunden, was dann wiederum den Abbau des Proteins auslöst (Ruggiano *et al.*, 2014).

Von Yos9 und Hrd3 gelangen die luminalen Substrate dann vermutlich über Der1 zu Hrd1 und werden anschließend im zytosolischen Teil von Hrd1 ubiquitiniert (Mehnert *et al.*, 2014). Dieser Schritt des HRD-Ligase vermittelten Endoplasmatisches Retikulum-assoziierten Proteinabbaus ist bisher am wenigsten verstanden. Wie partiell gefalteten und mit hydrophilen Glykanen modifizierten Substraten ein Durchqueren der ER-Membran ermöglicht wird, kann bisher nicht eindeutig erklärt werden. Es gibt aber eine Reihe verschiedener Hypothesen die in Abschnitt 1.5 ausführlicher erläutert werden sollen. Während membranständige Substrate mit luminaler Fehlfaltung ebenfalls über Hrd3 rekrutiert werden, scheint für die Selektion membrangebundener Proteine mit Abnormitäten innerhalb der ER-Membran Hrd1 selbst verantwortlich zu sein (Sato *et al.*, 2009).

Allen HRD-Ligase Substraten gemein ist deren Ubiquitinierung im Zytosol (**Abbildung 1-4**). Hrd1 ist eine RING-Ubiquitinligase, deren Substrate hauptsächlich mit Hilfe des E2-Enzyms Ubc7 ubiquitiniert werden. In wenigen Fällen wurde eine Beteiligung von Ubc1 (Friedlander *et al.*, 2000) und Ubc6 (Hiller *et al.*, 1996) gezeigt. Ubc7 ist ein lösliches zytosolisches E2-Enzym welches über das in der Membran verankerte und mit der HRD-Ligase assoziierte Adaptorprotein Cue1 rekrutiert wird. Cue1 spielt zudem eine wichtige Rolle für die Prozessivität der K48-verknüpften Ubiquitinkettenbildung durch Ubc7 (Bagola *et al.*, 2013; von Delbrück *et al.*, 2016). Nach erfolgter Ubiquitinierung wird das ERAD-Substrat von der AAA-ATPase Cdc48 durch dessen Kofaktoren Npl4 und Ufd1 erkannt und unter ATP-Verbrauch aus der ER-Membran extrahiert (Jarosch *et al.*, 2002). Die Rekrutierung von Cdc48 zur HRD-Ligase wird über das membranständige Ubx2 Protein gewährleistet (Neuber *et al.*, 2005; Schuberth and Buchberger, 2005). Der Weg eines ERAD-Substrates aus dem ER zurück in das Zytosol wird als Dislokation des Proteins bezeichnet. Nach erfolgter Ubiquitinierung und Dislokation gelangen die ERAD-Substrate über Shuttlefaktoren wie Dsk2 und Rad52 zum Proteasom, in dem sie dann proteolytisch abgebaut werden (Medicherla *et al.*, 2004; Ruggiano *et al.*, 2014).

Während das Hefegen für Hrd1 von *S. cerevisiae* ein nicht-essentielles Gen darstellt, wirkt die Deletion eines *HRD1*-homologen Gens in der Keimbahn von Mäusen letal auf den Embryo (Yagishita *et al.*, 2005). Ursache dafür ist eine verstärkte Apoptose von Leberzellen. Fetale Leberzellen produzieren vermehrt sekretorische Proteine, die die Homöostase des ER belasten können. Die Verringerung der Anzahl an Leberzellen führt letztlich zu einer gestörten Entwicklung der roten Blutkörperchen.

Die meisten experimentellen Daten über das Hefe-ERAD-System wurden durch Verwendung artifizieller Substrate erhoben, da bisher nur wenige endogene Substrate bekannt sind. Im Gegensatz dazu konnten für das Säugetiersystem bereits eine ganze Reihe solcher Proteine identifiziert werden (Ye *et al.*, 2018). Dazu gehören z.B. Ire1 $\alpha$ , pre-B-Zellrezeptor, p53, die schwere Kette der MHC-Klasse I Moleküle (Hwang and Qi, 2018) sowie ERAD spezifische Faktoren wie OS-9 (Ye *et al.*, 2018)



**Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der HRD-Ubiquitinligase sowie assoziierter Komponenten.**

Im Rahmen des ERAD-Prozesses werden fehlgefaltete, luminal ER-Proteine durch die HRD-Ligase erkannt und einem zytosolischen Abbau durch das 26S Proteasom zugeführt. Über die luminalen Komponenten Hrd3 und Yos9 werden die Substrate an den Komplex rekrutiert. Das membranständige Usa1 stellt ein Strukturprotein dar, welches sowohl an Der1 als auch an Hrd1 bindet. Darüber hinaus ist es für eine Dimerisierung des Komplexes verantwortlich. An der Dislokation der Substrate sind Der1 und Hrd1 beteiligt. Eine genaue Funktionsweise des Prozesses ist bisher jedoch nicht bekannt. Gelangen die Substrate ins Zytosol, werden sie mit Hilfe der Hrd1-RING-Domäne und dem assoziierten E2 Ubc7 ubiquitiniert. Ubc7 wird über Cue1 an den Komplex gebunden. Für die Extraktion der Substrate aus der Membran wird die AAA-ATPase Cdc48 über Ubx2 an die HRD-Ligase rekrutiert (modifiziert von Martin Mehnert, 2012; Xu & Ng, 2015; Größenangaben basieren auf den Einträgen aus der *Saccharomyces cerevisiae* genome databank (SGD; Cherry *et al.*, 2012).

## 1.5 Der Export von ERAD-Substraten aus dem ER

ERAD-Substrate werden proteasomal abgebaut und müssen daher während dieses Prozesses aus dem ER extrahiert werden. Allerdings befinden sich lösliche sekretorische Proteine während ihrer Reifung vollständig im ER-Lumen. Bei Fehlern im Faltungsprozess müssen also solche Polypeptide durch die ER-Membran zurück in das Zytosol transportiert werden. Weil es sich bei diesem Vorgang um einen gerichteten Prozess handelt, ist von einem energieabhängigen Mechanismus auszugehen. Die Hydrolyse von ATP durch die AAA-ATPase Cdc48 könnte die notwendige Energie bereitstellen, wie genetische und biochemische Untersuchungen zeigen (Jarosch *et al.*, 2002; Ye *et al.*,

2003; Garza *et al.*, 2009). Über mögliche Mechanismen sowie über die Beschaffenheit der für die Dislokation erforderlichen Exportstruktur wurde bereits viel spekuliert. Ob die Extraktion von Proteinen aus dem ER über eine kanalartige Öffnung bzw. Pore erfolgt, ähnlich dem Sec61-Translokon beim Import von Proteinen in das ER, ist noch nicht abschließend geklärt. Charakteristisch für ERAD-Substrate sind neben ihrer Vielfalt ihr zumindest teilweise gefalteter Zustand, die Glykanmodifizierungen und das Fehlen einer Signalsequenz für den Export. Ob die Substrate für den Durchtritt durch die ER-Membran entfaltet werden oder nicht ist noch nicht eindeutig geklärt. In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein ERAD-Substrat mit einer luminalen GFP-Domäne nach dem Rücktransport ins Zytosol noch fluoreszent und damit gefaltet ist. Eine spontane Rückfaltung des GFP im Zytosol konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden (Fiebig *et al.*, 2002). Wenig umstritten ist jedoch die Beobachtung, dass die Glykanmodifizierungen erst im Zytosol, nach erfolgter Dislokation durch zytosolische Glykanasen entfernt werden (Hosomi *et al.*, 2016). Allein aufgrund dieser verzweigten, von einer Hydrathülle umgebenen Zuckerstruktur kann für die Dislokation der ERAD-Substrate durch eine Pore ein erheblicher Durchmesser notwendig sein. Dies würde einen sehr verlässlichen Öffnungs- und Schließmechanismus der Pore nach sich ziehen, um das oxidierende Milieu aufrechtzuerhalten und einen Austritt von Calcium-Ionen zu verhindern. Neben einer starren Pore wie dem Sec61-Translokon ist auch ein adaptiver Transportmechanismus wie beim Import von Proteinen in die Peroxisomen vorstellbar (Abschnitt 1.5.2). Eine gänzliche Alternative zum Export durch eine Pore würde das vesikuläre Abschnüren von Membranbereichen wie die Lipid-Droplet Bildung darstellen (Fei *et al.*, 2009). Um den ERAD-Prozess letztlich möglichst effizient zu gestalten ist davon auszugehen, dass sich die luminalen, Substrat rekrutierenden Faktoren sowie die zytosolische Ubiquitinierungsmaschinerie möglichst in räumlicher Nähe zur Dislokation der Substrate befinden sollten. Über die Kinetik der Dislokation gibt es bisher jedoch ebenfalls noch keine genaueren Angaben.

### 1.5.1 Beteiligung von Sec61, Der1 und Hrd1 an der Dislokation

Eine vorgeschlagene Variante für die Dislokation der ERAD-Substrate stellt deren „Rücktransport“ durch das Sec61 Translokon dar (Römis, 2016). Dafür spricht, dass sowohl für ERAD-Substrate als auch für Komponenten der HRD-Ligase eine Assoziation mit Sec61 gezeigt werden konnte (Pilon *et al.*, 1997; Schäfer and Wolf, 2009; Pereira *et al.*, 2019). Darüber hinaus reichern sich bei Verwendung einer temperatur-sensitiven Variante von Sec61, Sec61-2 (Deshaies and Schekman, 1987), einige ERAD-Substrate im ER-Lumen an, ohne dass jedoch der Import durch das Translokon beeinträchtigt zu sein scheint (Plempner *et al.*, 1997). Allerdings ist nicht ausgeschlossen, dass der Import zeitlich verzögert stattfindet oder dass die Komponenten der HRD-Ligase zum Translokon rekrutiert werden während das fehlerhaft gefaltete Protein noch mit dem Translokon assoziiert ist. Strukturanalysen haben gezeigt, dass der Durchmesser der Öffnung des gebildeten Kanals ungefähr 2 nm beträgt (Berg *et al.*, 2004). Diese Größe reicht zwar für den Import ungefalteter Proteine aus, wäre aber für gefaltete bzw. mit Glykanen modifizierte ERAD-Substrate zu eng. Darüber hinaus wird der Sec61-Kanal luminal durch eine helikale Struktur, den *Plug*, verschlossen die beim Durchtritt von Proteinen von der zytosolischen Seite her verdrängt werden kann (Li *et al.*, 2016). Anhand struktureller Modelle ist es schwierig vorstellbar, dass diese Helix auch den Durchtritt in die entgegengesetzte Richtung erlauben würde.



Andere Ergebnisse zeigen, dass die HRD-Ligase-Komponente Der1 essentiell für den Abbau luminaler ERAD-Substrate ist (Knop *et al.*, 1996). Durch Verwendung eines photoaktivierbaren *Crosslinkers*, der spezifisch für eine bestimmte Aminosäure innerhalb der Der1 Proteinsequenz eingebaut wurde, konnte *in vivo* eine räumliche Nähe zwischen Membranbereichen von Der1 und luminalen ERAD Substraten nachgewiesen werden (Mehnert *et al.*, 2014). Diese räumliche Nähe zwischen Substrat und Der1 veränderte sich unter Verwendung von Der1 Mutanten die einen Abbaufekt verursachten. Aufgrund seines hohen Membrananteils und aufgrund seiner Eigenschaft Oligomere auszubilden, könnte Der1 demnach entscheidend am Dislokationsprozess beteiligt sein. In Säugerzellen gibt es drei Homologe zu Der1, Derlin-1, -2 und -3. Auch diese Proteine sind am Abbau von ERAD-Substraten über Hrd1 und das homologe gp78 beteiligt (Oda *et al.*, 2006; Greenblatt *et al.*, 2011). Ein retrograder Transport von Proteinen aus Mikrosomen wird durch Antikörper gegen Derlin-1 inhibiert (Wahlman *et al.*, Cell 2007). Derlin-1 weist eine gewisse Sequenzähnlichkeit zu Rhomboid-Proteasen auf, wobei die proteolytisch aktiven Reste fehlen. Rhomboid-Proteasen erleichtern durch eine Beeinflussung der Membranstruktur den Spaltungsprozess von Membranproteinen (Kreutzberger *et al.*, 2019). Eine Deformierung der ER-Membran könnte auch die Dislokation von ERAD-Substraten erleichtern. Weiterhin konnte auch für das zu Der1 homologe Hefe-Protein Dfm1 eine Wechselwirkung mit der HRD-Ligase und ein Einfluss auf den Substratabbau nachgewiesen werden (Stolz *et al.*, 2010; Neal *et al.*, 2018). Dfm1 verfügt, wie übrigens auch die Derlins, über zwei zytosolische SHP-Box-Domänen die eine Rekrutierung der AAA-ATPase Cdc48 ermöglichen (Sato and Hampton, 2006). Die Auswirkungen einer Deletion von Dfm1 lassen sich aufgrund einer schnellen Suppression schwierig beobachten. Wie gezeigt werden konnte handelt es sich bei dem Dfm1-supprimierenden Protein um Hrd1, der zentralen Komponente der HRD-Ligase (Neal *et al.*, 2018).

Hrd1 weist einen hohen Anteil Membran durchspannender Helices auf. Während bisherige Modelle basierend auf Strukturvorhersagen und biochemischen Analysen (Deak and Wolf, 2001) von 6 Transmembranhelices ausgingen, wurde in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit basierend auf Cryo-EM-Analysen ein Strukturmodell mit 8 Transmembranhelices vorgeschlagen (Schoebel *et al.*, 2017). Auch Hrd1 bildet Dimere und Daten, basierend auf Gelfiltrationsanalysen (Carvalho *et al.*, 2006) sowie Immunopräzipitationen mit verschiedenartig markierten Hrd1-Varianten innerhalb einer Zelle, unterstützen die Vermutung, dass Hrd1 sowie die HRD-Ligase generell als ein hoch-molekularer und als Dimer organisierter Proteinkomplex vorliegt (Carvalho *et al.*, 2006, 2010; Horn *et al.*, 2009). Durch die lokale Häufung der Hrd1-Transmembranhelices könnte die Integrität der ER-Membran verändert sein und den Durchtritt luminaler ERAD-Substrate ermöglichen ohne ein unkontrolliertes Diffundieren von Calcium-Ionen zu bedingen. Bekannt ist außerdem, dass eine sehr starke Überexpression von Hrd1 in der Hefezelle dazu führt, dass ERAD-Substrate unabhängig von den anderen Komponenten der HRD-Ligase abgebaut werden können (Carvalho *et al.*, 2010). Allerdings ist nicht geklärt, ob durch die Überexpression auch die Spezifität des ERAD-Prozesses erhalten bleibt. Auch in einem *in vitro*-System mit artifiziellen Mikrosomen konnte gezeigt werden, dass Hrd1 als alleinige Komponente der HRD-Ligase in der Lage ist, in der Mikrosomenmembran verankerte Substrate mit einer luminalen Domäne zu ubiquitinieren und somit eine Extraktion derselben durch Cdc48 zu ermöglichen (Baldrige and Rapoport, 2016). Offen blieb bei diesem methodischen Vorgehen jedoch, ob eine Hrd1-induzierte Dislokation des Substrates für die Ubiquitinierung nötig war. Auch ein leicht zugänglicher Membrananker des Substrates könnte die Hrd1-abhängige Ubiquitinierung

ermöglichen. Außerdem wurde neben dem Substrat auch Hrd1 selbst ubiquitiniert und aus der Membran extrahiert. Das an Hrd1 gebundene Substrat könnte daher auch so seinen Weg aus den Mikrosomen gefunden haben.

Wie bereits erwähnt wurde kürzlich anhand von Cryo-EM Analysen eine erste Proteinstruktur von Hrd1 veröffentlicht (Schoebel *et al.*, 2017). Es wurde überexprimiertes Hrd1 zusammen mit überexprimiertem Hrd3 aus Hefezellen aufgereinigt. Beide Proteine bildeten einen Komplex bestehend aus einem Hrd1-Homodimer, an dem zwei Hrd3 Moleküle gebunden waren. Das aus den Cryo-EM-Daten abgeleitete Modell zeigt, dass jedes Hrd1 Monomer eine Pore, geformt von 6 der 8 Transmembranhelices, bildet. Die Autoren sprechen zudem von einem hydrophoben Deckel der ein Verschließen der Hrd1-Pore gewährleisten soll. Ob die beobachtete kanalartige Öffnung wirklich der Dislokation von luminalen ERAD-Substraten dient, bleibt aber spekulativ, da vom Modell abgeleitete *in vivo*-Experimente fehlen.

### 1.5.2 Proteinimport peroxisomaler Proteine – eine mögliche Analogie

Bereits bei den Prokaryoten finden sich kanalartige Transportsysteme, die einen Übertritt von Proteinen über biologische Membranen ermöglichen. Solche, in Struktur und Funktion ähnliche Transportkanäle ermöglichen auch den Import von Proteinen in Mitochondrien, Chloroplasten und in das ER (Agarraberes and Dice, 2001). Bei diesen Apparaten werden in der Regel ungefaltete Polypeptide mittels einer engen Pore durch die Membran geschleust. Erst nach dem Transport erfolgt die Proteinfaltung. Im Gegensatz dazu ist das Transportsystem der Peroxisomen in der Lage vollständig gefaltete und in Proteinkomplexen assemblierte Polypeptide durch die peroxisomale Membran zu bringen. Peroxisomen können in der Zelle verschiedene Aufgaben übernehmen. Von Hefezellen weiß man, dass sie eine größere Anzahl an Peroxisomen besitzen, wenn sie anstelle von zuckerhaltigem Medium vorwiegend auf fettsäurehaltigem Medium kultiviert werden (Farré *et al.*, 2018). In den Peroxisomen findet dann vor allem die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren statt, die mit Hilfe spezieller Enzyme in das für Mitochondrien zur ATP-Gewinnung geeignete Acetyl-CoA zerlegt werden. Die enzymatische Ausstattung der Peroxisomen wird bereits im Zytosol synthetisiert und gelangt mit Hilfe peroxisomaler Signalsequenzen in gefalteter, mitunter oligomerisierter Form in die Peroxisomenmatrix. Dafür wird ein adaptiver Transportmechanismus durch Bildung einer transienten Pore benutzt, an dem verschiedene Proteine beteiligt sind (Meinecke *et al.*, 2010; Montilla-Martinez *et al.*, 2015). Proteine, die in Peroxisomen gelangen werden, weisen eine von zwei spezifischen Erkennungssequenzen, die *peroxisomal targeting sequence* 1 oder 2 auf. Diese Signalsequenz wird von den löslichen, im Zytosol zirkulierenden peroxisomalen Rezeptorproteinen Pex5 oder Pex7 erkannt und gebunden. Zusammen mit dem Substrat gelangen Pex5 und Pex7, durch Bindung an einen *docking complex*, an die Peroxisomenmembran. Anschließend integrieren die Rezeptorproteine durch konformationelle Änderungen in die Peroxisomenmembran wo sie zusammen mit Proteinen des *docking complexes* eine transiente Pore bilden die den Substraten ein Durchdringen der Peroxisomenmembran ermöglicht (Farré *et al.*, 2018). *In vitro*-Experimente mit rekonstituierten Liposomen haben gezeigt, dass ein Porendurchmesser von bis zu 90 Å erreicht werden kann (Meinecke *et al.*, 2010). Wie genau die Translokation der Substrate vollzogen wird ist im Detail noch nicht bekannt (Barros-Barbosa *et al.*, 2019). Ist das Substrat in die Matrix der Peroxisomen entlassen, wird der

Importkomplex durch Recycling der Rezeptoren Pex5 / Pex7 wieder aufgelöst. Für diesen Schritt ist eine Ubiquitinierung der Rezeptoren durch membranständige Ubiquitinligasen erforderlich. Das monoubiquitinierte Pex5 / Pex7 wird dann durch membranassoziierte AAA-ATPasen erkannt und unter ATP-Verbrauch sowie teilweiser Entfaltung aus der Peroxisomenmembran extrahiert (Pedrosa *et al.*, 2018). Dadurch stehen die Rezeptorproteine im Zytosol für eine neue Runde an Substratimport zur Verfügung.

## 1.6 Zelluläre Stressreaktion und „*The unfolded protein response*“

Geraten die Qualitätskontrollmechanismen des ER aus dem Gleichgewicht und kommt es in Folge zu einer Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen in diesem Kompartiment, erfolgt eine zelluläre Stressreaktion, die als „*unfolded protein response*“ (UPR) bezeichnet wird (Walter P and Ron D, 2011). Die UPR beeinflusst eine ganze Reihe von Stoffwechselwegen in der Zelle, die dazu führen sollen die Proteinhomöostase wieder herzustellen. Zu den Prozessen, die gesteigert werden, zählen u.a. die Erhöhung der Faltungskapazität im ER durch Chaperone sowie eine Erhöhung der ERAD-Kapazität durch verstärkte Bildung der dafür benötigten Komponenten. Gleichzeitig wird durch eine Verringerung der zellulären Translation eine Reduktion der Menge neusynthetisierter Proteine angestrebt. Die Aktivierung der UPR wird strikt reguliert, da eine andauernde UPR-Reaktion ebenfalls schädlich ist und zur Apoptose der Zelle führen kann (Walter P and Ron D, 2011).

In Säugetieren existieren drei Signaltransduktionswege, die über ihre Sensormoleküle, Ire1, ATF6 und PERK, unterschiedliche Stressantworten aktivieren (Senft and Ronai, 2015). In der Bäckerhefe ist nur der Ire1-Signalweg vorhanden. Ire1 ist ein membranständiges ER-Protein, welches eine Sensordomäne in das ER-Lumen exponiert und über eine als Kinase und RNase agierende zytosolische Domäne verfügt. Bei einer Anhäufung ungefalteter Proteine im ER-Lumen kommt es aufgrund des erhöhten Bedarfs an Chaperonen zunehmend zu einer Dissoziation des Chaperons Kar2 von Ire1 (Kimata *et al.*, 2004). Die Bindung von Kar2 hält einen monomeren Zustand der Ire1 Proteine aufrecht während eine Dissoziation von Kar2 und die Assoziation ungefalteter Proteine die Bildung hoch-molekularer Ire1-Multimere auslöst (Walter and Gardner, 2011). Infolge dieser Oligomerisierung kommt es zur Aktivierung der zytosolischen Komponenten von Ire1. Durch die Kinasedomäne erfolgt eine *trans*-Autophosphorylierung, durch welche die gebildeten Oligomere zusätzlich stabilisiert werden (Lin *et al.*, 2007). Die anschließende Aktivierung der RNase Domäne führt zum Herausschneiden eines Introns der translationsinaktiven HAC1-Vorläufer-mRNA (van Anken *et al.*, 2014). Die gespleißte Variante der HAC1-mRNA ermöglicht die Synthese des Hac1-Proteins, welches im Zellkern die Transkription von Genen, deren Promotoren ein *UPR response element* enthalten, induziert. Zu diesen Genen gehören unter anderem solche, die für ER-spezifische Chaperone wie Kar2 oder Pdi1 (Patil and Walter, 2001) kodieren als auch für Komponenten der HRD-Ligase wie Der1, Hrd1, Hrd3 und Ubc7. Durch eine Induktion der UPR wird einerseits die Fähigkeit des ERs gesteigert, neu-synthetisierte Polypeptide zu falten und an ihren Bestimmungsort zu transportieren, andererseits wird auch die Kapazität erhöht, fehlgefaltete Polypeptide über ERAD zu entfernen (Giampieri, 2010).

## 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Eine Voraussetzung für den Abbau fehlgefalteter Proteine aus dem ER ist deren Dislokation in das Zytosol. Dabei müssen in ihrer Struktur sehr unterschiedliche Substrate die ER-Membran passieren. Dieser Schritt der „ER-assoziierten Protein Degradation“ (ERAD) ist bisher am wenigsten verstanden. Es gibt jedoch erste Hinweise dafür, dass neben der Ligaseuntereinheit Der1 auch das zentrale E3 Enzym Hrd1 an der Dislokation beteiligt ist. Das Ziel dieser Arbeit war eine funktionelle Charakterisierung der Transmembranregion von Hrd1, um deren Rolle in der Dislokation von ERAD-Substraten besser zu verstehen. Durch Generierung von Hrd1-Transmembran-Varianten sowie deren zellbiologische und biochemische Charakterisierung sollte zunächst ein spezifischer Einfluss dieser Veränderungen auf den Abbau luminaler ERAD-Substrate analysiert werden. Darüber hinaus sollte mit Hilfe von zielgerichtetem *in vivo photo-crosslinking* die Transmembranregion von Hrd1 auf eine räumliche Nähe zu Substratmolekülen hin untersucht werden. Die neu gewonnenen Erkenntnisse sollten zu einem besseren Verständnis der Rolle von Hrd1 in der Dislokation von ERAD-Substraten führen und in einem Modell zusammengefasst werden.

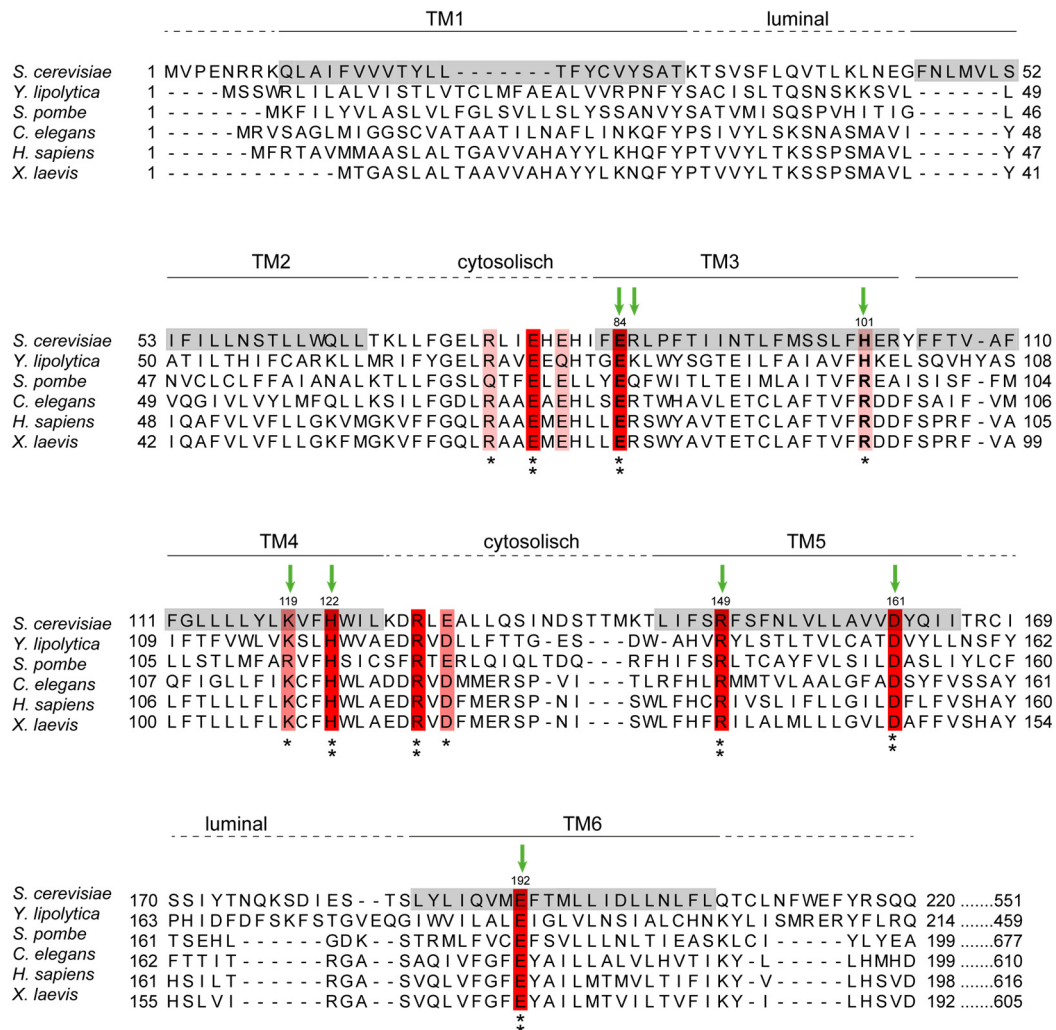
## 2 Ergebnisse

### 2.1 Die Bedeutung der Transmembranregion von Hrd1 für den Abbau von ERAD-Substraten

#### 2.1.1 Identifizierung von Hrd1-Varianten mit einem reduzierten Abbauvermögen von ERAD-L Substraten

Eine wesentliche Funktion des Ligaseproteins Hrd1 des HRD-Komplexes ist die Ubiquitinierung der Substrate. Allerdings könnte Hrd1 aufgrund der großen Transmembranregion auch eine direkte Rolle bei der Dislokation von luminalen ERAD-Substraten spielen. Ist dies der Fall, wären vor allem geladene Reste innerhalb dieser Region daran beteiligt. Ein Austausch dieser Aminosäuren würde dann zu einem Defekt der HRD-Ligase führen der spezifisch den Abbau luminaler ERAD-Substrate betrifft. Die Degradation membranständiger Proteine dürfte bei einer Störung der Dislokation hingegen weitestgehend normal funktionieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollten Hrd1-Transmembran-Varianten generiert werden. Grundlage für die Auswahl der Hrd1-Varianten bildete ein Sequenzvergleich mit dem konservierte, geladene Aminosäuren der Membranregion identifiziert werden sollten. Die Auswertung zeigte, dass sich nur vereinzelt solche Reste innerhalb der postulierten Hrd1-Helices befinden. Dabei handelt es sich um E84, H101, L119, H122, R149, D161 sowie E192. Weitere geladene Aminosäuren befinden sich in den zytosolischen Schleifen der Membranregion (**Abbildung 2-1**, rötlich hervorgehoben). Erste Analysen zum Einfluss der identifizierten Reste auf den Substratabbau erfolgten im Rahmen einer früheren Diplomarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe (Benko, 2007; **Abbildung 2-1** grüne Pfeile). Dabei deutete sich ein Abbaudefekt für das luminale ERAD-Substrat CPY\* für zwei der analysierten Hrd1 Varianten an.

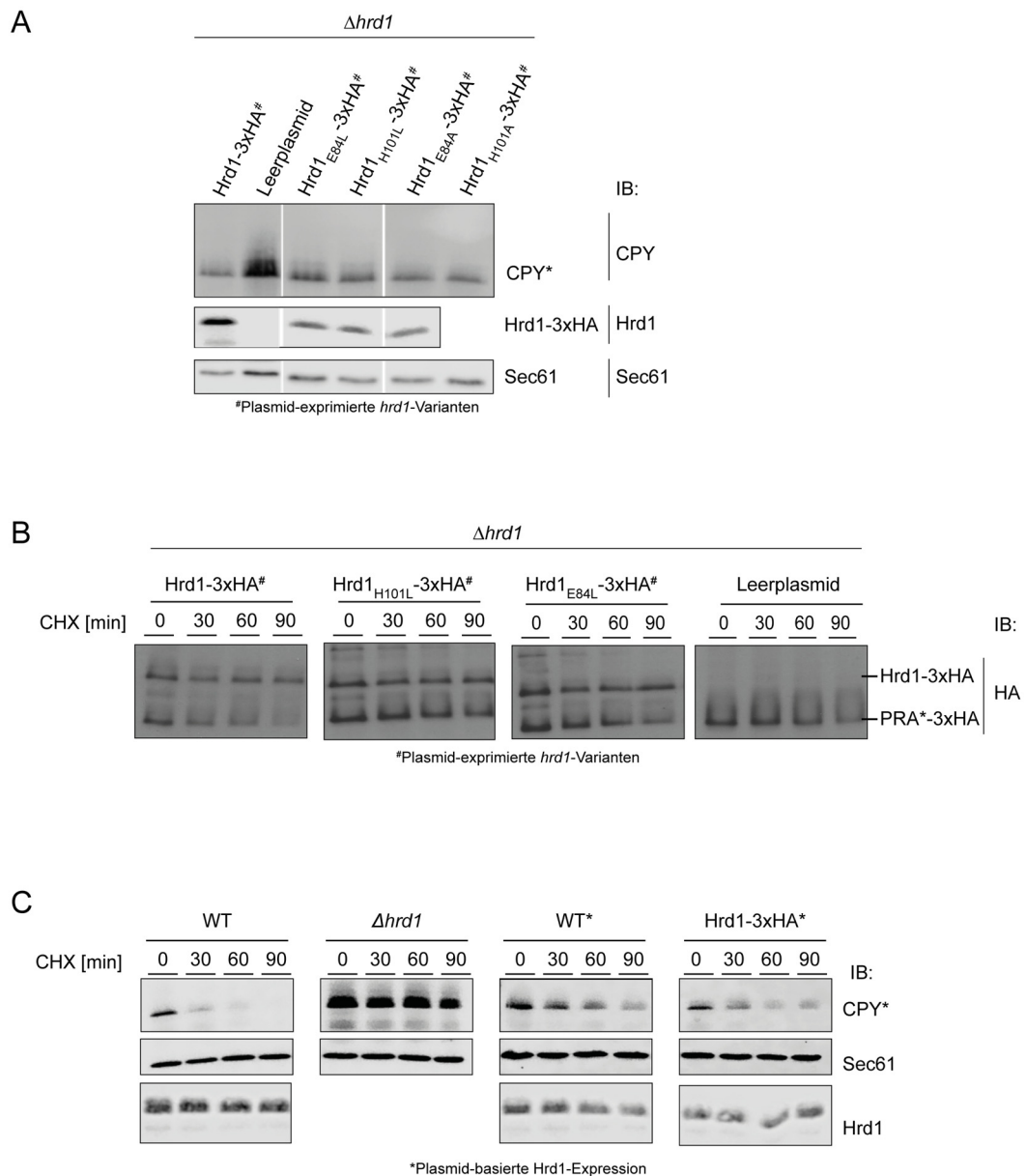
Bei den auffälligen Hrd1-Varianten der Diplomarbeit handelte es sich um Hrd1<sub>E84L, R85L</sub> und Hrd1<sub>H101L, K267E</sub>. Die eingeführte zweite Substitution war jedoch teilweise unbeabsichtigt. Da es sich nur bei E84 und H101 um im Alignment identifizierte Reste handelte sollte ein Effekt dieser beiden Aminosäuren auf den Substratabbau genauer analysiert werden. Dafür wurden E84 sowie H101 jeweils separat durch Leucin oder Alanin ersetzt. Die entsprechend veränderten *hrd1*-Gene wurden Plasmid-basiert in einem  $\Delta$ *hrd1*-Stamm exprimiert. Die verwendeten Hefen produzierten außerdem das luminale ERAD-Substrat CPY\*, eine fehlgefaltete Variante der vakuolären Carboxypeptidase Y. Durch eine Analyse der CPY\*-Mengen im jeweiligen Hefeextrakt sollte eine erste Beurteilung der Hrd1-Varianten hinsichtlich eines Abbaudefekts erfolgen. Ein Vergleich der Zelllysate zeigte jedoch kaum Unterschiede in den CPY\*-Level zwischen Hrd1 und den Hrd1-Varianten (**Abbildung 2-2 A**).



**Abbildung 2-1: Sequenzvergleich der Membranregion von Hrd1.** Proteinsequenzen von Hrd1-Homologen verschiedener Organismen wurden in einem Sequenzvergleich mit Hilfe des Programms MultAlin zusammengestellt (Corpet, 1988). In abgestuften Rot-Tönen hervorgehoben sind konservierte, geladene Reste. Grau unterlegt sind die bioinformatisch vorhergesagten Transmembranhelices von Hrd1 aus *S. cerevisiae*. Grüne Pfeile zeigen die Positionen an, die bereits in einer früheren Diplomarbeit von Edgar Benko analysiert wurden (Benko, 2007).

Für eine genauere Analyse der Hrd1-Varianten wurde daraufhin der Substratabbau über einen definierten Zeitraum in einem Cycloheximid-Abbauxperiment verfolgt. Die Substanz Cycloheximid hemmt die eukaryotische Proteinbiosynthese und ermöglicht eine Untersuchung der Stabilität bereits existierender Proteine. Neben CPY\* wurde auch das ERAD-Substrat PRA\* analysiert. Bei PRA\* kommt es aufgrund einer Mutation im Gen der Proteinase A zu einer Fehlfaltung. In den Cycloheximid-Abbauxperimenten ließ sich ein Defekt von Hrd1<sub>E84L</sub> und Hrd1<sub>H101L</sub> in der PRA\*-Degradation erkennen (**Abbildung 2-2 B**). Allerdings ergaben sich auch bei dieser experimentellen Vorgehensweise uneindeutige Ergebnisse zwischen den einzelnen Wiederholungen und den beiden ERAD-Substraten. Ein Grund für die Schwierigkeiten bei der Auswertung schien ein verminderter Substratabbau des, durch Plasmid-basierte Expression erhaltenen Hrd1 Proteins zu sein. Sowohl für den Abbau von CPY\* als auch für PRA\* ist eine Halbwertszeit von ungefähr 30 min bekannt. Diese wurde jedoch nicht von Hrd1 erreicht, wenn das *HRD1*-Gen auf

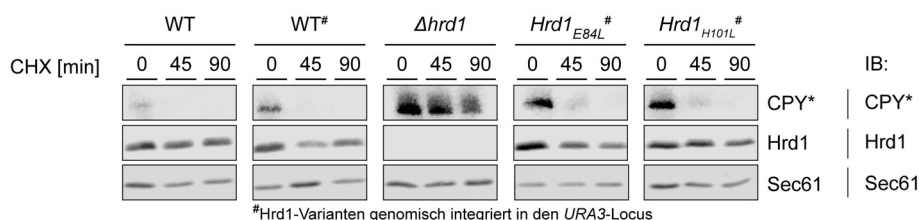
einem Plasmid kodiert war (**Abbildung 2-2 C**). Weitere Analysen von Hrd1-Varianten sollten dadurch nur noch mit genomisch integrierten Konstrukten erfolgen.



**Abbildung 2-2: Analyse von Hrd1-Punktmutanten auf verminderten Abbau von Modellsubstraten.** A) Untersuchung der Akkumulation von CPY\* durch plasmidkodierte, CUP-Promoter exprimierte Hrd1-Varianten mit 3xHA Epitop. Verwendet wurde ein  $\Delta hrd1$ -Stammhintergrund der CPY\* genomisch exprimiert. Vergleich der Substratmengen in der späten logarithmischen Wachstumsphase. Als Ladekontrolle dient Sec61. Die Detektion des Substrats sowie der Hrd1-3xHA Varianten und des Sec61 erfolgte mittels spezifischer Antikörper im Immunoblot. B) Cycloheximid-Abbauexperiment zur genaueren Charakterisierung des Substratabbauverhaltens der Hrd1-3xHA-Varianten aus A). Als weiteres luminales Modellsubstrat wurde Plasmid exprimiertes PRA\*-3xHA analysiert. C) In einem Cycloheximid-Abbauexperiment wird genomisch kodiertes *HRD1* plasmid-basierten *HRD1*-Konstrukten gegenübergestellt. Plasmid-kodiertes *HRD1* (WT<sup>#</sup>) führt zu verringertem Abbau des luminalen ERAD-Substrates CPY\* verglichen zu genomisch integriertem *HRD1* (WT). Als Ladekontrolle diente Sec61. Sec61, Hrd1 und CPY\* wurden im Immunoblot mittels spezifischer Antikörper detektiert.

### 2.1.2 Die genomische Integration der Hrd1-Konstrukte führt zu deutlicheren Unterschieden im Substratabbau durch die Hrd1-Varianten

Zur weiteren Untersuchung wurden die Hrd1-Konstrukte *HRD1<sub>E84L</sub>* und *HRD1<sub>H101L</sub>* genomisch in den *URA3*-Locus eines *hrd1*-Deletionsstammes integriert. Anschließend wurde erneut die Degradation von CPY\* in einem Cycloheximid-Abbauxperiment analysiert. Beim Vergleich der CPY\*-Mengen zeigte sich eine deutliche Anreicherung des Substrats in den Hefezellen mit den Hrd1-Varianten zum Zeitpunkt null. Trotzdem konnte auch in diesen Zellen ein relativ schneller Abbau von CPY\* innerhalb der analysierten 90 min beobachtet werden (**Abbildung 2-3**). Letztendlich ließ sich mit dieser Vorgehensweise nur schwer ein Unterschied in der Abbaukinetik für CPY\* zwischen den Hrd1-Varianten und dem Wildtyp zeigen. Um den beobachteten Einfluss der vorgenommenen Veränderungen an Hrd1 auf den Substratabbau zu verdeutlichen, sollte im Folgenden mit der kombinierten Variante, Hrd1<sub>E84L, H101L</sub>, weitergearbeitet werden.



**(Abbildung 2-3: Substitutionen innerhalb der Transmembranregion von Hrd1 führen zum verminderten Abbau von CPY\*.** Cycloheximid-Experiment um den Einfluss von Hrd1<sub>E84L</sub> und Hrd1<sub>H101L</sub> auf den Abbau des luminalen ERAD-Substrates CPY\* zu analysieren. Hierfür wurden die Hrd1-Varianten genomisch in den *URA3*-Locus integriert. Der Abbau von CPY\* sowie die Stabilität der Hrd1-Varianten wurden über einen Zeitraum von 90 min verfolgt. Als Referenz für die Proteinmengen wurde das Protein Sec61 verwendet. Alle Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper im Immunoblot nachgewiesen.

### 2.1.3 Hrd1<sub>E84L, H101L</sub> zeigt einen spezifischen Abbaufekt für luminal ERAD-Substrate

Die kombinierte Variante Hrd1<sub>E84L, H101L</sub> sollte nun hinsichtlich ihres Funktionsverlustes für Substrate verschiedener Klassen analysiert werden. Um später eine Aussage über die Beteiligung der Membranregion von Hrd1 an der Dislokation machen zu können, war es wichtig zu klären, ob Hrd1<sub>E84L, H101L</sub> ausschließlich den Abbau luminaler Substrate beeinflusst. Zunächst wurde daher erneut die Degradation von CPY\* und PRA\* im Cycloheximid-Abbauxperiment verfolgt. Hierbei konnte ein deutlicher Defekt im Abbau der Substrate bei den Hrd1<sub>E84L, H101L</sub> produzierenden Hefen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (**Abbildung 2-4 A, B**).

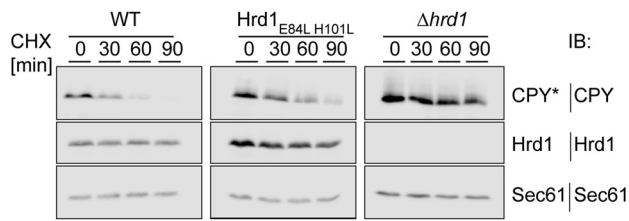
Neben den luminalen Substraten CPY\* und PRA\* wurden zwei weitere Substrate der ERAD-L Klasse analysiert. Sie zeichnen sich ebenfalls durch eine Fehlfaltung einer luminalen Domäne aus, sind jedoch durch einen Membrananker an der ER-Membran lokalisiert. Dennoch wurde auch für diese Substrate eine Der1 abhängige Degradation und damit der gleiche Abbaupfad, wie für rein luminaler Substrate gezeigt. Zum Einen handelt es sich um das Substrat KWW. Es stellt ein Fusionsprotein aus einem luminalen ERAD-Substrat, dem KHN, sowie der Membranregion und der zytoplasmatischen Domäne des Wsc1 Proteins dar (Vashist and Ng, 2004). Zur Analyse der Hrd1-Variante hinsichtlich des Abbaufähigkeits von KWW wurde ebenfalls ein Cycloheximid-



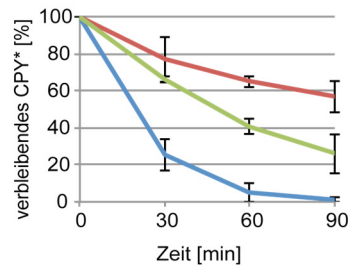
Abbauexperiment gewählt. Übereinstimmend mit den vorangegangenen Ergebnissen wurde auch bei der Degradation von KWW eine Verzögerung und damit ein Abbaufekt festgestellt (**Abbildung 2-4 C**). Zum Anderen handelt es sich um das Substrat CTL\*, ein Derivat des CPY\*. Es ist zusammengesetzt aus dem luminalen CPY\*, einem membrandurchspannenden Bereich und dem Produkt des *LEU2*-Gens auf der zytoplasmatischen Seite. CTL\* ermöglicht ein Wachstum Leucin-auxotropher Hefen in Minimalmedium. Da es aber Hrd1-abhängig degradiert wird, ist ein Funktionsverlust der HRD-Ligase eine Voraussetzung für Zellwachstum (Medicherla *et al.*, 2004). Eine Einschätzung des Abbaus von CTL\* durch die Hrd1-Variante wurde anhand eines Wachstumsexperiments vorgenommen. Dazu wurde eine Serie von 1:5 Verdünnungen entsprechender Hefen auf Selektionsplatten getropft und das Wachstum der Zellen nach ca. 48 h analysiert. Es zeigte sich ein deutlich besseres Wachstum der Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> produzierenden Zellen im Vergleich zum Wildtyp (**Abbildung 2-4 D**). Dieses Ergebnis weist auf einen Funktionsverlust der Hrd1-Variante hinsichtlich des Abbaus von CTL\* hin. Die durchgeführten Experimente zum Abbauvermögen der Hrd1-Variante zeigen somit übereinstimmend einen Defekt in der Degradation luminaler ERAD-Substrate.

Zur weiteren Charakterisierung von Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> wurden neben den luminalen Substraten nun membranständige ERAD-M Substrate untersucht. Diese Proteine zeichnen sich durch eine Fehlfaltung innerhalb der Membranregion aus. Sie werden ebenfalls Hrd1-abhängig abgebaut, jedoch ohne Beteiligung der Ligasekomponente Der1. In dieser Arbeit wurden die Membranproteine Hmg2, PDR5\* sowie Sec61-2 als Vertreter der ERAD-M-Klassen ausgewählt. Zur Beurteilung der Degradation von Hmg2 sowie von PDR5\* durch die Hrd1-Variante wurden erneut Cycloheximid-Abbauexperimente durchgeführt. Für beide Substrate konnte eine dem Wildtyp entsprechende Abbaukinetik festgestellt werden (**Abbildung 2-5 A, B**). Allerdings viel für das Substrat PDR5\* eine erhöhte Proteinmenge zum Zeitpunkt null bei der Hrd1-Variante auf. Um eine veränderte Produktion von PDR5\* in den Hefen mit der Hrd1-Variante auszuschließen, wurde daraufhin ein *Pulse-Chase* Experiment durchgeführt. Im *Pulse-Chase* Experiment werden ab einem bestimmten Zeitpunkt alle neu synthetisierten Proteine radioaktiv markiert und anschließend nur deren Abbau verfolgt. Auch im *Pulse-Chase* Experiment wurde eine leicht erhöhte Menge an PDR5\* in Hefen mit der Hrd1-Variante festgestellt (**Abbildung 2-5 B.2**). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des CHX-Abbauexperimentes entsprach die Abbaukinetik für PDR5\* aber auch im *Pulse-Chase* Experiment der des Wildtyp (**Abbildung 2-5 B.3**). Das Vorhandensein des veränderten Hrd1 scheint demnach zu einer gesteigerten Produktion dieses ERAD-M Substrates zu führen. PDR5\* ist eine mutierte Variante des ABC-Transporters PDR5. PDR5 ist ein Protein der Plasmamembran und exportiert verschiedene Chemikalien sowie Sterole aus der Hefezelle. Die Expression kann von vielen Transkriptionsfaktoren reguliert werden, darunter einige die durch Hitzestress aktiv werden. Verschiedene Chemikalien können die Fehlfaltung von Proteinen begünstigen und eine Stressreaktion in der Zelle auslösen. Daher ist es durchaus denkbar, dass eine Störung des ERAD-Abbauweges durch ein verändertes Hrd1 zu einer gesteigerten Produktion von PDR5 führt. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit aber nicht weiter verfolgt.

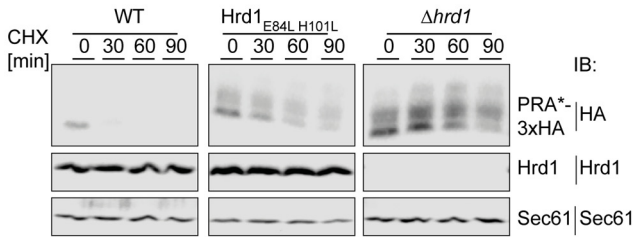
## A.1 CPY\*



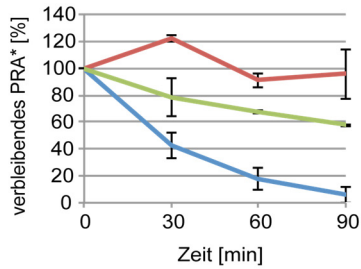
## A.2



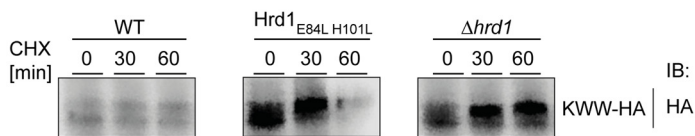
## B.1 PRA\*



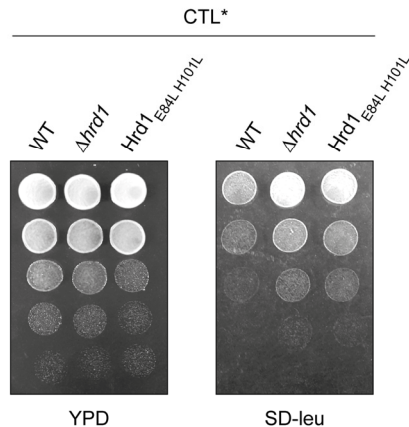
## B.2



## C KWW



## D CTL\*



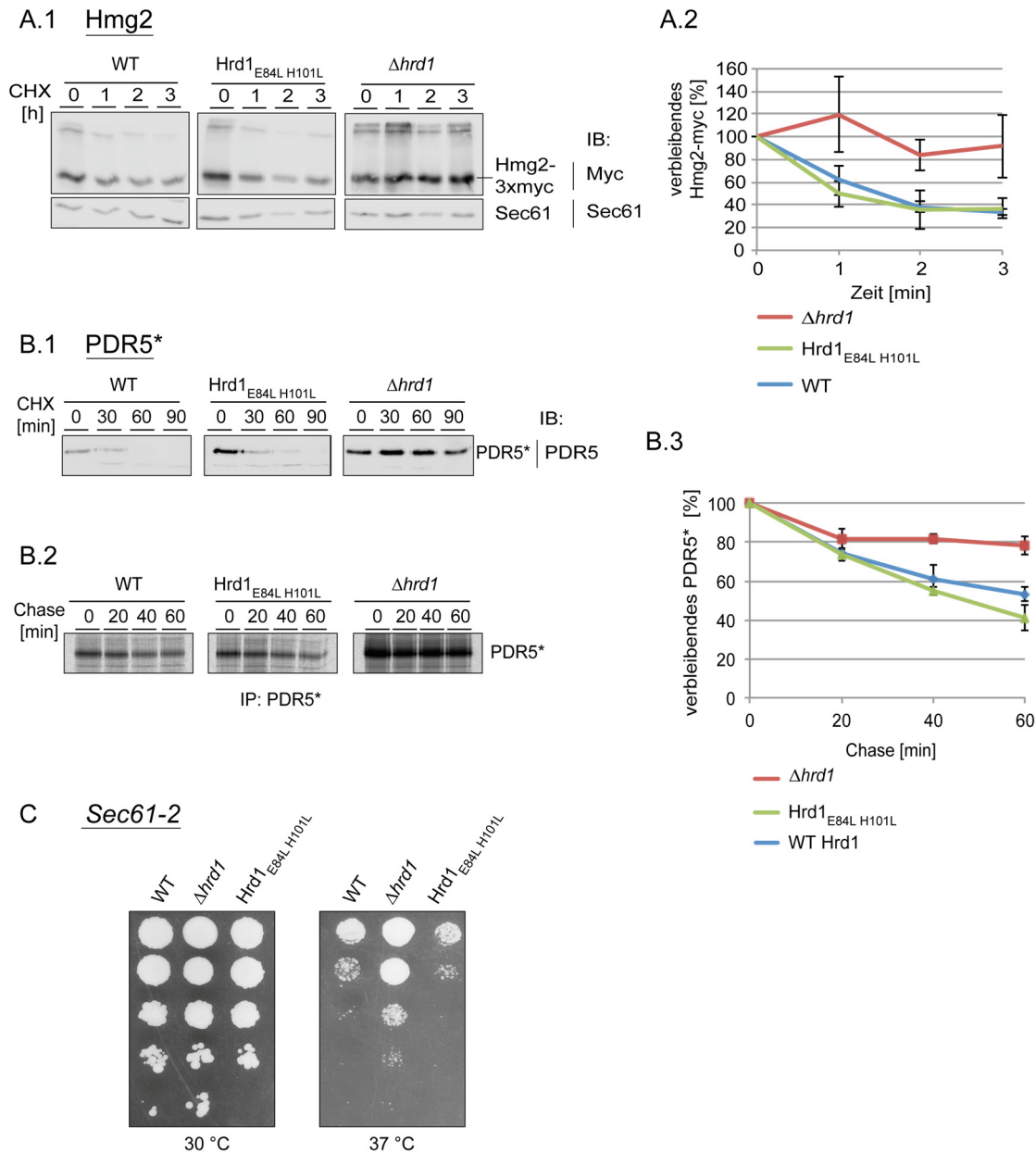
**Abbildung 2-4: Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> zeigt spezifische Abbaudefekte für luminale ERAD-Substrate.** Zur Analyse seiner Funktionalität wurde *HRD1<sup>E84L, H101L</sup>* in den URA3-Locus verschiedener Hefestämme integriert. A.1) Cycloheximid-Abbauxperiment mit CPY\* über 90 min. Als Referenzprotein diente Sec61. A.2) Quantifizierung der CPY\*-Mengen dreier unabhängiger Experimente wie in A.1 mithilfe des Programms Fiji. B.1) Cycloheximid-Abbauxperiment mit PRA\*-3xHA. Durchführung wie in A.1, B.2) Quantifizierung der PRA\*-3xHA Mengen analog zu A.2. C) Cycloheximid-Abbauxperiment über 60 min mit dem membranständigen ERAD-L Substrat KWW-HA. Alle Proteinnachweise erfolgten mittels spezifischer Antikörper im Immunoblot. D) Abbau des membranständigen ERAD-L Substrats CTL\* (CPY\*-Leu2 Fusion) durch Hrd1<sup>E84L, H101L</sup>. 1:5 Verdünnungen von Hefen auf YPD und SD-leu Medium. Wachstum auf SD-leu deutet auf einen gestörten Abbau von CTL\* hin.

Die Charakterisierung der Degradation von Sec61-2 durch die Hrd1-Variante erfolgte in einem Wachstumsexperiment. Sec61-2 ist eine Temperatur-sensitive Variante des Sec61 Translocons. Bei einer erhöhten Temperatur wird es Hrd1-abhängig abgebaut. Die Hefen sterben aufgrund eines fehlenden, funktionsfähigen Translocons ab. Zellen in denen ein Defekt der HRD-Ligase auftritt, können hingegen überleben. Die Auswertung des Wachstumsexperiments zeigte für die Hrd1-Variante die gleiche Anfälligkeit gegenüber erhöhter Temperatur wie für Wildtyp-Zellen. Dementsprechend ist von einem identischen Abbau des Substrates Sec61-2 auszugehen (**Abbildung 2-5 C**).

Zusammenfassend lässt sich anhand der beschriebenen Substratabbauexperimente feststellen, dass die Variante Hrd1<sub>E84L, H101L</sub> einen Funktionsverlust spezifisch für die Der1-abhängigen ERAD-L Substrate aufweist. Dies sind die Substrate, für die eine Dislokation aus dem ER-Lumen erforderlich ist.

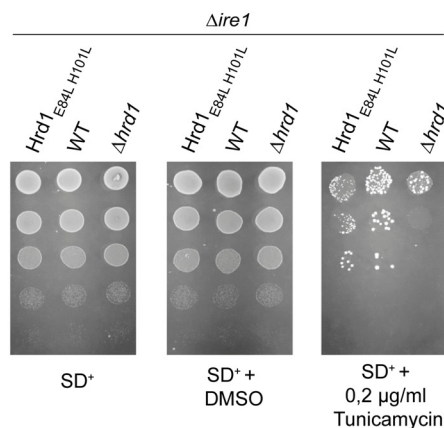
#### 2.1.4 Die Stresstoleranz von Hrd1<sub>E84L, H101L</sub>-produzierenden Zellen ist leicht vermindert

Da die Variante Hrd1<sub>E84L, H101L</sub> einen Abbaudedefekt für ERAD-Substrate aufweist ist anzunehmen, dass sich Substrate im ER-Lumen anreichern. Dieser Effekt sollte umso stärker sein, je größer die Belastung der Zelle mit fehlgefalteten Proteinen wird. Demnach sollten Hrd1<sub>E84L, H101L</sub> produzierende Hefezellen einen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp vor allem unter Stressbedingungen haben. Um die Stresstoleranz zu überprüfen wurde ein Wachstumstest unter Verwendung verschiedener Stressoren durchgeführt. Dabei wurde das Wachstum des Wildtyp mit dem Wachstum von Hrd1<sub>E84L, H101L</sub> produzierenden Hefen verglichen. Als Stressoren wurden eine erhöhte Konzentration des Reduktionsmittels DTT, eine erhöhte Temperatur von 37 °C und die Inhibierung der Protein-N-Glykosylierung durch das Reagenz Tunicamycin verwendet. Um eine Anpassung der Zellen an die Stresssituation zu verhindern, wurden die Experimente in einem *ire1*-Deletionsstamm durchgeführt. Eine Induktion der UPR wurde dadurch unterbunden. Es zeigte sich, dass unter den verwendeten Bedingungen der Wachstumsunterschied zwischen den Hefen mit der Hrd1-Variante und dem Wildtyp nur sehr gering ausgeprägt war. Die Foto-Dokumentation des Wachstumsexperiments nach Behandlung der Zellen mit DTT bzw. einer erhöhten Temperatur führte zu keinen nachvollziehbar erkennbaren Unterschieden. Lediglich in dem Wachstumsexperiment bei dem die Hefen einer Tunicamycin-Konzentration von 0,2 µg/ml ausgesetzt waren, ließ sich ein vermindertes Wachstum der Hrd1<sub>E84L, H101L</sub>-produzierenden Hefen im Vergleich zum Wildtyp nachvollziehbar dokumentieren (**Abbildung 2-6**).



**Abbildung 2-5: Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> zeigt wildtypischen-Abbau von ERAD-M Substraten.** A.1) Degradation von Hmg2-3xmyc durch Hrd1-Varianten im Cycloheximid-Abbauxperiment. HmgCoA-3xmyc wurde im Immunoblot mittels Epitop-spezifischem Antikörper detektiert. Als Referenzprotein diente Sec61., A.2) Quantifizierung von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Cycloheximid-Experimenten wie exemplarisch in A.1) gezeigt... Intensitäten der Immunoblot-Signale wurden mittels Fiji-Software ermittelt. B.1) Cycloheximid-Abbauxperiment wie in A.1), jedoch für den Substratabbau von PDR5\* über 90 min.. B.2) Autoradiogram von einem *Pulse-Chase*-Experiment zur ergänzenden Analyse von Hrd1<sup>E84L, H101L</sup>-Effekten auf den Abbau von PDR5\*. Identischer Stammhintergrund wie in B.1). Nach einer *Pulse*-Zeit von 8 min zur Inkorporation von <sup>35</sup>S wurde der Abbau von PDR5\* nach dem *Chase* über einen Zeitraum von 60 Minuten verfolgt. B.3) Quantifizierung dreier unabhängig voneinander durchgeführter *Pulse-Chase*-Experimente von PDR5\*. Intensitäten der Signale wurden mittels Fiji-Software ermittelt. C) Analyse des Abbaus von Sec61-2 durch Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> mittels Wachstumstest. Gezeigt sind 1:10 Verdünnungen eines Temperatur-sensitiven Sec61-2 Hefestammes mit *HRD1* bzw. *HRD1<sup>E84L, H101L</sup>* oder  $\Delta$  auf YPD-Agarplatten nach ca. 24 h bei permissiver und restriktiver Temperatur.

Eine andere Möglichkeit die ER-Stresstoleranz der Hefen zu überprüfen bietet die Untersuchung der UPR. Beim Überschreiten einer bestimmten Belastungsgrenze durch Anreicherung fehlgefalteter Proteine wird die UPR induziert. Dies kann über den Nachweis der gespleißten Variante der mRNA des Transkriptionsfaktors Hac1 erzielt werden. Dieser ist für die Genregulation nach UPR-Aktivierung erforderlich. In einem Experiment wurde daher die RNA von WT und Hrd1<sup>E84L, H101L</sup>-produzierenden Hefen isoliert und in cDNA umgeschrieben. An dieser wurde dann mit Hilfe Hac1 spezifischer Primer eine PCR-Reaktion durchgeführt. Der Vergleich der PCR-Produkte zwischen der Hrd1-Variante und dem WT deutete auf eine ähnliche, wenig induzierte UPR-Reaktion in beiden Hefen hin. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit DTT führte andererseits sowohl beim WT als auch bei der Hrd1-Variante zu einer ähnlich starken UPR-Induktion (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass die Veränderungen der Hrd1-Variante die Stresstoleranz der Hefen unter den analysierten Bedingungen wenig beeinflussen.



**Abbildung 2-6: Unter Stressbedingungen wirkt sich Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> nachteilig auf das Zellwachstum aus.** Wachstumstest zum Vergleich der Stresstoleranz zwischen einem Stammhintergrund mit *HRD1* und genomisch integriertem Hrd1<sup>E84L, H101L</sup>. Die Zellen produzierten außerdem das luminal ERAD-Substrat CPY\*. Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet und in serieller 1:5 Verdünnung auf SD<sup>+</sup>-Platten getropft die entweder unbehandelt, mit DMSO oder mit 0,2 µg/ml Tunicamycin versetzt waren. Tunicamycin ist eine chemische Substanz die die N-verlinkte Glykosylierung der Proteine inhibiert. Die Hefeplatten wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert und anschließend das Wachstum der Zellen verglichen.

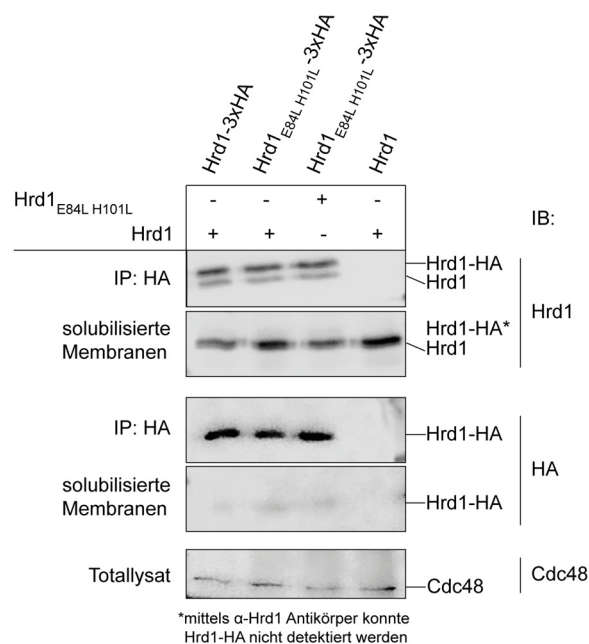
### 2.1.5 Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> ist korrekt mit der HRD-Ligase assembliert

Für den Abbau von Substraten ist die korrekte Assemblierung aller HRD-Ligase Komponenten wichtig. Besonders für den Abbau luminaler Substrate ist die Assoziation mit Der1 unabdingbar. Mit Hilfe einer Ko-Immunopräzipitation unter nicht-denaturierenden Bedingungen sollte daher überprüft werden, ob die Komponenten Usa1, Hrd3 und Der1 wie beim Wildtyp auch mit Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> assembliert sind. Dazu wurde genomisch integriertes Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> mit einem c-terminalen dreifachen HA-Epitop markiert und mit Hilfe eines Epitop spezifischen Antikörpers nach der Präparation der Mikrosomen gefällt. Die Ligasekomponenten wurden anschließend in einem Immunoblot durch Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen. Es zeigte sich, dass sowohl Usa1 als auch Hrd3 durch Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> wie durch den WT gefällt werden konnten (**Abbildung 2-7 A**). Die



### 2.1.6 Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> bildet Dimere

Nachdem die Rekrutierung der wichtigsten HRD-Ligasekomponenten durch die Hrd1-Variante nicht geändert zu sein schien sollte nachfolgend eine Beeinflussung der Hrd1-Dimerisierung untersucht werden. Verschiedene Untersuchungen der HRD-Ligase legen nahe, dass es sich bei der funktionell aktiven Ligase um einen dimeren Proteinkomplex handelt (siehe Einleitung 1.5.1). Vermittelt wird diese Assemblierung durch das Strukturprotein Usa1, welches eine intrinsische Fähigkeit zur Dimerisierung besitzt. Gleichzeitig bindet es an Hrd1 als auch an Der1. Eine Assoziation zweier Hrd1-Proteine wird daher durch Usa1 ermöglicht. Zur näheren Untersuchung der Hrd1-Dimerisierung wurde gleichzeitig nicht-markiertes und Epitop-markiertes Hrd1 in der Hefe produziert. Mit Hilfe einer Ko-Immunopräzipitation unter nicht-denaturierenden Bedingungen sollte eine Beeinflussung der Dimerisierung durch Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> analysiert werden (**Abbildung 2-8**). Es wurde untersucht, ob eine veränderte Menge an unmarkiertem Hrd1 nachgewiesen wird, wenn dieses nicht durch den WT sondern durch die Hrd1-Variante gefällt wird. Durch die Epitop-Markierung entsteht ein Größenunterschied zu nicht markiertem Hrd1. Dadurch lassen sich beide Proteine im Immunoblot mittels Hrd1-Antikörper unterscheiden. Die Auswertung des Experiments zeigte, dass bei Verwendung der Hrd1-Variante die gleiche Menge an nicht-markiertem Hrd1 präzipitiert wurde wie bei Vorhandensein des WT. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die Dimerisierung nicht durch das veränderte Hrd1 beeinträchtigt wird.

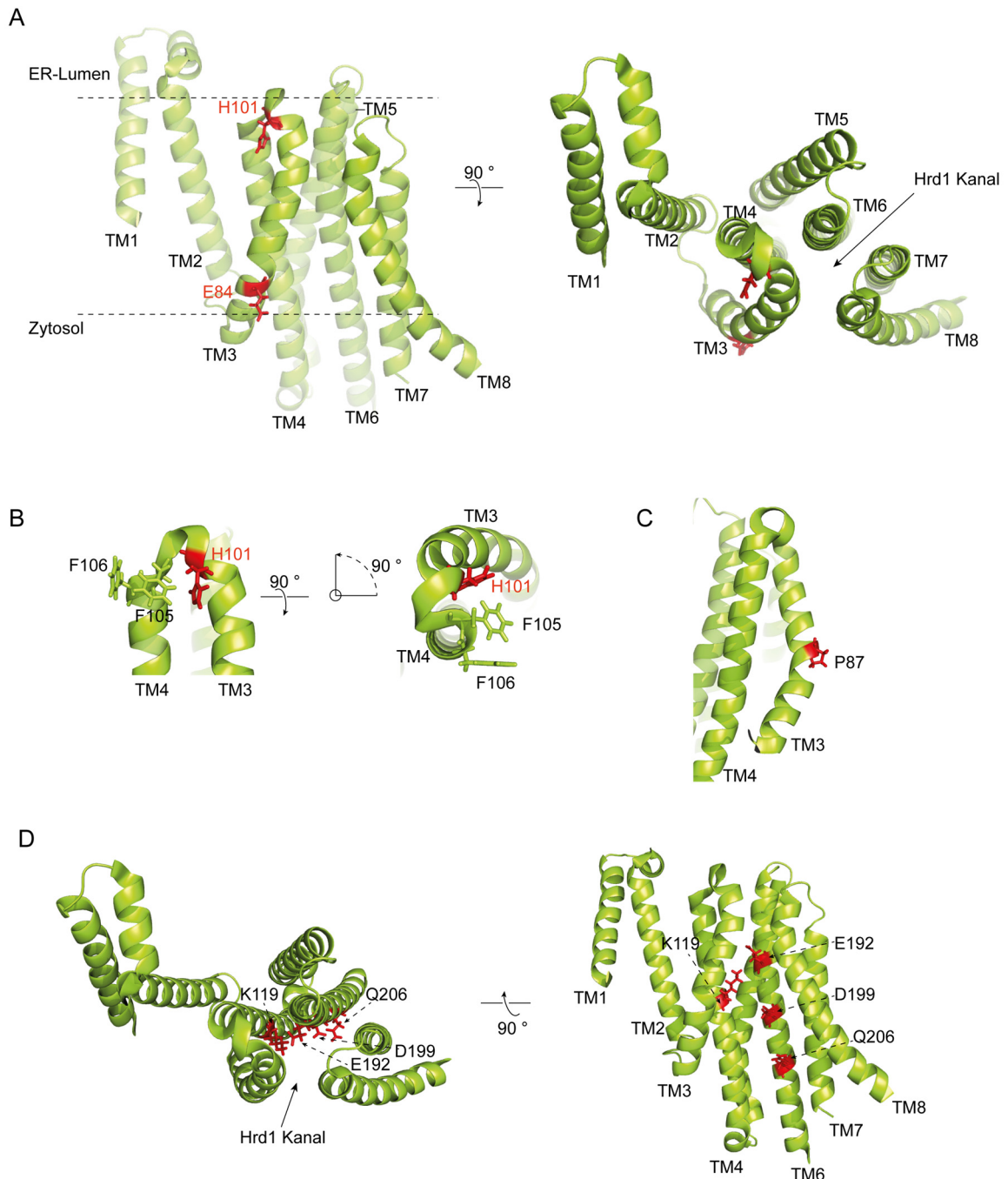


**Abbildung 2-8: Die Dimer-Ausbildung von Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> ist nicht gestört.** Im selben Stammhintergrund wurde *ungetaggt*es und Epitop-markiertes Hrd1 bzw. Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> ko-produziert, wobei jeweils die Epitop-markierte Variante genomisch integriert wurde und die nicht-getaggte Variante mit einem Plasmid transformiert wurde. Durch Immunopräzipitation der Epitop-markierten Hrd1-Variante unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurde analysiert, ob sich die jeweilige ungetaggte Hrd1-Variante mit fällen lässt. Die Menge an mitgefällter Hrd1-Variante wurde im Immunoblot mittels Hrd1-spezifischem Antikörper detektiert und zwischen den Ansätzen mit Hrd1<sup>E84L, H101L</sup>-3xHA wildtypischen Hrd1-3xHA verglichen. Dabei diente Cdc48 als Referenzprotein für den Zellaufschluß.

### 2.1.7 Einfluss von Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> auf die Ausbildung eines Dislokationskanals

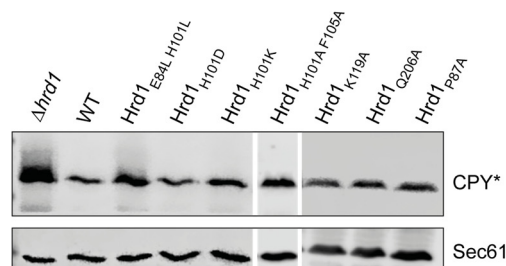
Basierend auf Ko-Immunopräzipitationsexperimenten wurde in den vorangegangenen beiden Abschnitten gezeigt, dass sich die Substitutionen der Aminosäuren E84 und H101 weder auf die Rekrutierung weiterer Komponenten noch auf die Dimerisierung der HRD-Ligase auswirken. Um dennoch Hinweise für den Funktionsverlust von Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> zu erhalten, wurde die Lage beider Aminosäuren im, während den Experimenten zu dieser Arbeit veröffentlichten, Strukturmodell eines dimeren Hrd1-Hrd3 Komplexes untersucht. Das Modell basiert auf Cryo-Elektronenmikroskopischen Analysen und schlägt eine von Hrd1 gebildete, zentrale Pore für die Dislokation der HRD-Ligasesubstrate vor (**Abbildung 2-9 A**). Die beiden zu analysierenden Aminosäuren E84 und H101 befinden sich, wie auch anhand von Topologievorhersagen angenommen wurde, in der dritten Helix von Hrd1. Diese Helix ist Bestandteil der vorgeschlagenen Exportpore sodass Veränderungen dieser Helix durchaus zu einer Beeinträchtigung der Dislokation führen könnten. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass das H101 am äußerten, zum ER-Lumen hin gerichteten Ende der Helix 3 gelegen ist und zusammen mit F105 und F106 ein Bindungsmotif darstellt, welches zur Ausprägung einer starken Krümmung der die Helices 3 und 4 verbindenden luminalen Schleife führt (**Abbildung 2-9 B**). Die Reste von H101, F105 und F106 sind zueinander so angeordnet, dass es zu Kationen- $\pi$  bzw.  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen kommt. Eine Eliminierung dieses Bindungsmotifs könnte damit die Lage der Helices 3 und 4 zueinander beeinflussen und womöglich eine Ursache für den Dislokationsdefekt von Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> sein. Ein weiteres Charakteristikum der Helix 3 von Hrd1 ist dessen starke Krümmung im dem Zytosol zugewandten Abschnitt. In diesem befindet sich auch das Glutamat 84. Für die zu beobachtende Krümmung der Helix 3 dürfte laut Modell das Prolin 87 verantwortlich sein (**Abbildung 2-9 C**). Da die beschriebene Krümmung eine seitliche Öffnung des vorgeschlagenen Substratkanals darstellen könnte, sollte auch überprüft werden, ob eine Substitution dieser Aminosäure ebenfalls zu einem Dislokationsdefekt führen könnte. Um die Aussagekraft des Strukturmodells speziell im Hinblick auf die vorgeschlagene Substratpore zu überprüfen, sollten zudem geladene Aminosäuren die in das Innere des Kanals weisen und an der Bindung zum Substrat während der Dislokation beteiligt sein sollten, durch Substitution auf einen Einfluss auf den Abbau luminaler ERAD-Substrate hin untersucht werden (**Abbildung 2-9 D**).





**Abbildung 2-9: Strukturmodell von Hrd1 basierend auf Cryo-EM Experimenten** (Schoebel *et al.*, 2017). Cartoon-Darstellung eines Hrd1 Monomers in Grün (pdb 5V6P). Hervorgehoben in Rot und als *stick*-Darstellung gezeigt sind die beiden Reste E84 und H101 die in der Hrd1 Variante Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> zu Leucin mutiert wurden. A) Lage und Anordnung der Hrd1 Helices innerhalb der ER-Membran, die durch zwei gestrichelte Linien angedeutet ist. Die ersten beiden Helices befinden sich separiert von den anderen 6 Helices und weisen deutlich ins ER-Lumen. Die Helices 3 bis 8 liegen gebündelt in der ER-Membran und sind zum Großteil membrandurchspannend. Unter Ausschluss der Helix 5 bilden die Helices 3 und 4 sowie 6, 7 und 8 eine kanalartige Struktur. Erkennbar ist außerdem eine laterale Öffnung des Kanals zum Zytosol hin. B) Helix 3 und 4 sind über eine sehr kurze luminal Schleife verbunden in der sich H101 befindet. Dem Imidazol-Ring des Histidins liegen zwei Phenolringe zweier benachbarter Phenylalaninreste gegenüber. Die Interaktion dieser 3 Ringe könnte zur Stabilisierung der luminalen Schleife betragen. C) Die laterale Öffnung des Hrd1 Kanals wird durch die Krümmung der beiden beteiligten Helices 3 und 6 begünstigt. Für die Krümmung der Helix 3 scheint das P87 (rot) verantwortlich zu sein. D) An der Weitergabe von Substraten durch das Kanalinnere sind hydrophile Aminosäuren beteiligt (Rot). Dabei handelt es sich um K119, Q206, E192 und D199.

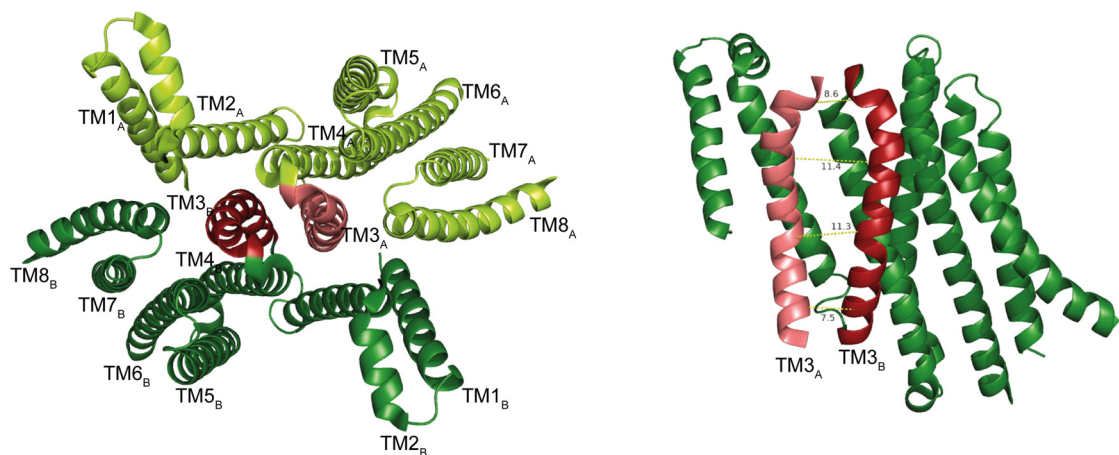
Zur Durchführung der genannten Untersuchungen wurden Hrd1-Mutanten generiert, die alle genomisch an den URA3-Locus eines entsprechenden *hrd1*-Deletionsstammes integriert wurden. Da speziell die Frage geklärt werden sollte, ob die anhand des Strukturmodells vorgenommenen Veränderungen einen Einfluss auf den Abbau luminaler ERAD-Substrate haben, wurde die Anreicherung des Modellsubstrats CPY\* als Hinweis auf einen Dislokationsdefekt analysiert. Da es bei einem verzögerten Substratabbau zu einer vermehrten Glykosylierung des CPY\* kommt, bietet neben einer erhöhten Proteinmenge auch die Beobachtung höhermolekularer Banden im Immunoblot einen entscheidenden Hinweis darauf. Wie der **Abbildung 2-10** zu entnehmen ist, konnte bei keiner der generierten Hrd1-Mutanten ein Hinweis auf einen Defekt im Abbau von CPY\* ähnlich dem des Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> gefunden werden. Die Reste E192 und D199 wurden bereits in einer Diplomarbeit eingehend hinsichtlich des Abbaus von CPY\* untersucht (Benko, 2007). Auch hierbei wurde kein Einfluss der Substitution festgestellt. Eine Erklärung für den Dislokationsdefekt von Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> konnte somit auch nicht mit Hilfe des Strukturmodells gefunden werden. Darüber hinaus stellen die durchgeführten Analysen die Aussagekraft des Modells hinsichtlich des Exportkanals auch generell in Frage.



**Abbildung 2-10: Vom Cryo-EM Strukturmodell abgeleitete Hrd1-Varianten zeigen keine Beeinträchtigung des CPY\*-Abbaus.** Ausgehend vom Strukturmodell für einen dimeren Komplex aus Hrd1 und Hrd3 wurden Hrd1-Varianten abgeleitet, die die Ursache des Abbaudefekts von Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> erklären könnten. Außerdem sollte die im Modell postulierte Kanalfunktion von Hrd1 *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden die entsprechenden *hrd1*-Varianten genomisch in den *URA3*-Locus eines *hrd1*-Deletionsstammes integriert. Um eine Aussage über einen Funktionsverlust der Hrd1-Varianten treffen zu können, wurde der Abbau des luminalen Modellsubstrats CPY\* analysiert. Es wurden aus Zelllysaten gewonnene Mikrosomen hinsichtlich der Menge an CPY\* untersucht. Diese wurde durch Detektion mit einem CPY\*-spezifischem Antikörper im Immunoblot bestimmt, wobei als Referenzprotein für die Proteinpräparation Sec61 verwendet wurde.

### 2.1.8 Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> zeigt eine verminderte Tendenz zur Ausbildung höher-molekularer HRD-Ligase-Komplexe

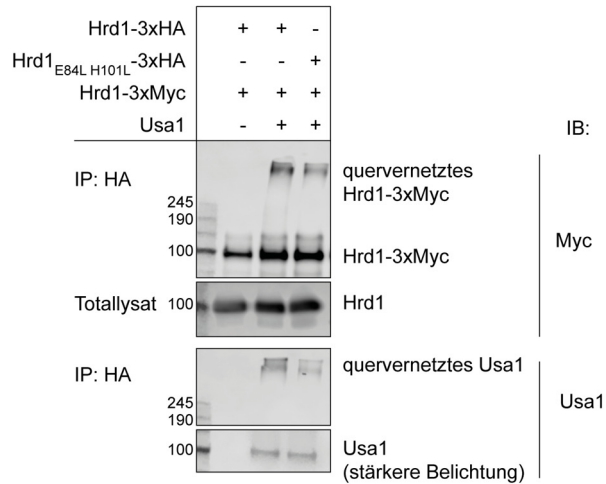
Anhand der Ko-IP Experimente ließ sich keine veränderte Rekrutierung der HRD-Ligasekomponenten sowie keine veränderte Dimerisierung von Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> feststellen. Da die Rekrutierung und Dimerisierung ausschließlich über Bindungen im Zytosol bzw. im Falle von Hrd3 über das ER-Lumen (siehe Abschnitt 2.2.5) erfolgt, kann die relative Anordnung der Ligase-Proteine in der Membran verändert sein, ohne das dies mit Hilfe der klassischen Ko-IP Experimente beobachtet werden würde. Wie im Strukturmodell in **Abbildung 2-11** zu erkennen ist, liegen sich genau die beiden dritten Helices der Hrd1-Monomere im Dimer gegenüber. Es wäre daher denkbar, dass Veränderungen in dieser dritten Helix durchaus zu Lageveränderungen der Hrd1 Monomere zueinander führen könnten.



**Abbildung 2-11: Modell des dimeren Hrd1-Komplexes basierend auf Cryo-EM Analysen** (Schoebel *et al.*, 2017). Dargestellt ist eine Cartoon-Repräsentation eines Hrd1 Dimers (pdb 5V6P). Die Monomere sind in unterschiedlichen Grüntönen gezeigt, wobei die dritte Helix des jeweiligen Monomers in verschiedenen Rottönen hervorgehoben ist. In der dritten Helix befinden sich auch die beiden Reste E84 und H101 (siehe **Abbildung 2-9**). A) Es wird ersichtlich, dass sich die beiden Helices 3 der Hrd1 Monomere im Dimer gegenüber liegen. B) Der Abstand zwischen einzelnen Atomen des Rückgrates beträgt zwischen rund 8 Å in den äußeren Bereichen und rund 11 Å im mittleren Bereich der beiden Helices.

Neben der Ko-IP unter nicht-denaturierenden Bedingungen zur Analyse der Dimerisierung der HRD-Ligase bietet der Einsatz eines chemischen *Crosslinkers* vor der Immunopräzipitation und eine anschließende Fällung der quervernetzten Proteinkomplexe unter denaturierenden Bedingungen eine alternative Möglichkeit diese Fragestellung zu ergründen. Für ein solches Experiment wurden zwei verschiedenen Epitop-markierte Hrd1-Spezies in einer Hefezelle koproduziert. Nach der Zelllyse wurde die präparierte Mikrosomenfraktion mit dem Crosslinker DSS inkubiert. Dieser trägt zwei Amin-reaktive funktionelle Gruppen und führt so zur Quervernetzung von Proteinen. Abschließend wurde die mit einem 3fachen HA-Epitop markierte Hrd1-Spezies gefällt und das mit einem 3fachen Myc-Epitop markierte Hrd1 mit einem spezifischen Antikörper im Immunoblot detektiert. Diese Analyse zeigte, dass sich bei Fällung von Hrd1<sup>E84L, H101L</sup>-3xHA weniger Usa1 und Hrd1-3xMyc in quervernetzten, höhermolekularen Oligomeren im Immunoblot nachweisen ließen als bei Verwendung von wildtypischem Hrd1 (**Abbildung 2-12**). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine Quervernetzung der HRD-Ligase bei Anwesenheit von Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> weniger gut möglich ist als bei Hrd1. Neben einer

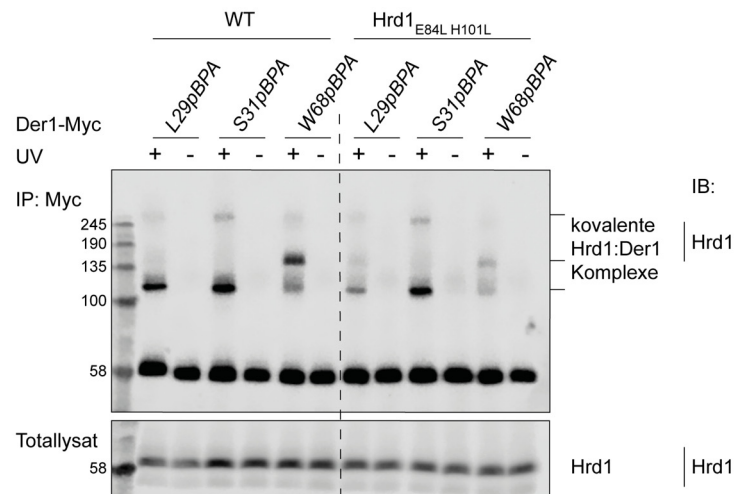
veränderten Zugänglichkeit für den Crosslinker könnte dies ein Hinweis dafür sein, dass die Anordnung der HRD-Ligase Komponenten innerhalb der Membran trotz korrekter Rekrutierung der Komponenten gegenüber dem Wildtyp verändert ist.



**Abbildung 2-12: Die Ausbildung höher-molekularer HRD-Ligase Komplexe ist durch Hrd1<sub>E84L, H101L</sub> verändert.** Chemisches Crosslinking der HRD-Ligase nach Mikrosomen Präparation. Zur vertiefenden Analyse der Assemblierung der HRD-Ligaseproteine mit Hrd1<sub>E84L, H101L</sub> erfolgte ein zufälliges Quervernetzen der HRD-Ligase durch Zugabe des membrangängigen Crosslinkers DSS. Dieser wurde zu präparierten Mikrosomen gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abstoppen der Crosslinking-Reaktion durch Zugabe primärer Amine wurde eine Immunopräzipitation der Epitop-markierten Hrd1-Varianten unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine in einem 6 % Acrylamidgel erfolgte die Detektion hochmolekularer Proteinkomplexe im Immunoblot mittels spezifischer Antikörper gegen Hrd1 bzw. Usa1.

### 2.1.9 Die räumliche Anordnung zwischen Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> und Der1 ist verändert

Die Hrd1-Variante Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> zeigt einen spezifischen Abbaufekt für Substrate mit einer luminalen Fehlfaltung. Charakteristisch für den Abbau genau dieser Substrate ist die Der1-Abhängigkeit des Substratabbaus. Aus diesem Grunde sollte abschließend die räumliche Lage von Der1 zur Hrd1-Variante mit Hilfe eines *in vivo photo-crosslinking* Experiments detaillierter analysiert werden (methodisches Vorgehen siehe Abschnitt 2.2.1). Wie gezeigt werden konnte befinden sich einige Bereiche der Der1-Transmembranregion in räumlicher Nähe zu Hrd1 (Mehnert, 2013). Einige dieser Positionen sollten daher auf Veränderungen dieser räumlichen Nähe bei Hrd1<sup>E84L, H101L</sup>-produzierenden Zellen im Vergleich zu wildtypischen Zellen untersucht werden. Wie sich aus dem Immunoblot in **Abbildung 2-13** mit Hilfe des Hrd1-spezifischen Antikörpers erkennen lässt, wurden für die Varianten Der1<sup>L29pBPA</sup> und Der1<sup>W68pBPA</sup> deutlich weniger quervernetzte Komplexe mit Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> detektiert als mit dem WT. Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass die relative Lage der Proteine Der1 und Hrd1 im Fall der Hrd1-Variante Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> verändert zu sein scheint.

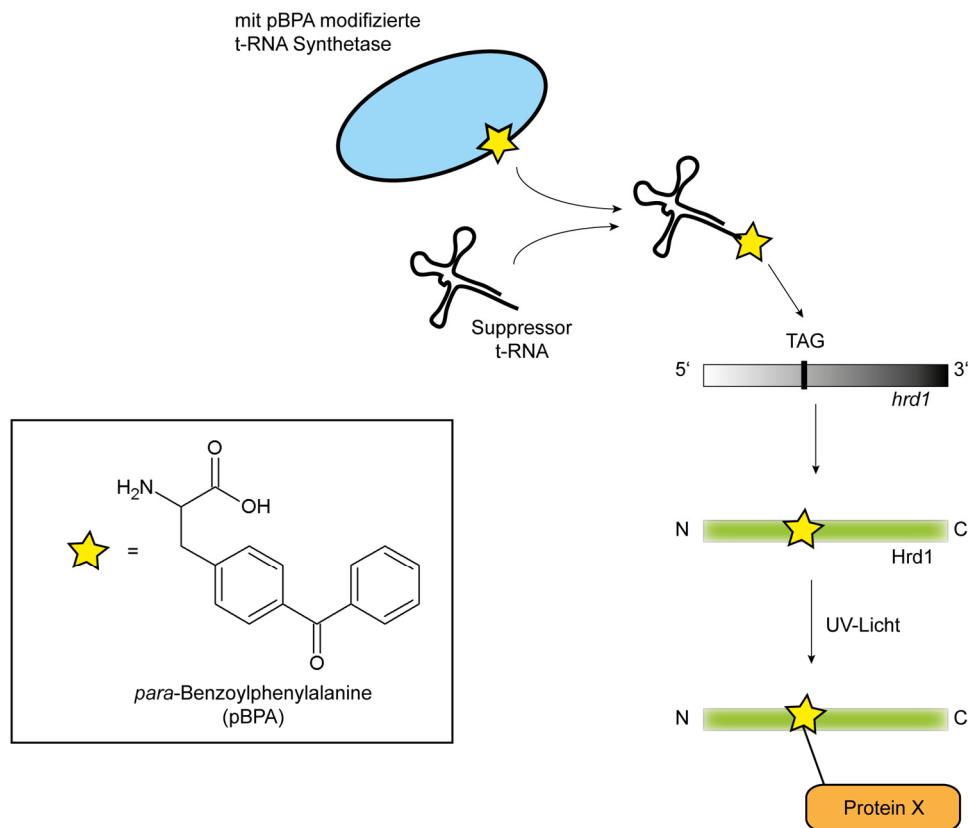


**Abbildung 2-13: Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> weist eine geänderte räumliche Orientierung zu Der1 auf.** *In vivo Photocrosslinking* mittels pBPA-markiertem Der1. Der1 zeigt an verschiedenen Positionen seiner Transmembranregion räumliche Nähe zu Hrd1 (Mehnert, 2012). Drei dieser Positionen wurden ausgewählt, um die räumliche Nähe von Der1 zu Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> zu untersuchen. Dafür wurde ein *hrd1*, *der1* Deletionsstamm verwendet in den *HRD1* bzw. *HRD1<sup>E84L, H101L</sup>* genomisch in den *URA3*-Locus integriert wurden. Anschließend wurde dieser Stamm mit dem gewünschten *der1*-(13xMyc)-Plasmid transformiert, sodass ein Einbau des Crosslinkers pBPA an die gewünschte Aminosäureposition der Der1-13xMyc-Variante erfolgte. Nach einer UV-Bestrahlung der Zellen von 45 min wurden diese lysiert und membranständige Proteine solubilisiert. Die Der1-13xMyc Varianten wurden anschließend durch Immunopräzipitation mittels Myc-Epitop spezifischem Antikörper unter denaturierenden Bedingungen gefällt. Zur Analyse kovalent *gecrosslinkter* Der1-Komplexe mit Hrd1 erfolgte eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Immunoblot und Hrd1 spezifischem Antikörper.

## 2.2 Charakterisierung der Transmembranregion von Hrd1 mittels zielgerichtetem *in vivo photo-crosslinking*

### 2.2.1 Zielgerichteter Einbau des Crosslinkers *p*-Benzoyl-L-Phenylalanin (pBPA) in ausgewählte Positionen von Hrd1

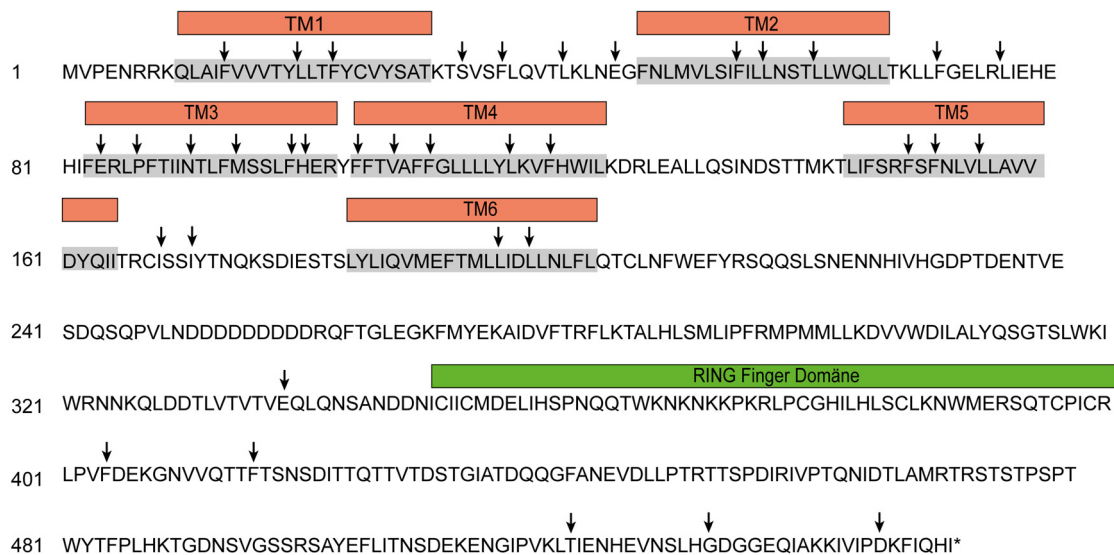
Die im vorangegangenen Abschnitt durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass die Transmembrandomäne von Hrd1 wichtig für den Abbau von luminalen ERAD-Substraten ist. In diesem Abschnitt soll analysiert, ob es auch eine räumliche Nähe von Substratmolekülen zu den Membranhelices von Hrd1 gibt. Dazu wurde die Methode des spezifischen *in vivo photo-crosslinkings* gewählt. Dabei handelt es sich um einen *Crosslinking*-Ansatz, bei dem der Crosslinker pBPA anstelle einer ausgewählten Aminosäure direkt in das Hrd1-Protein eingebaut wird. Zunächst wird dafür das ausgewählte Aminosäurecodon zu einem Stop-Codon mutiert. Die für das Experiment verwendeten Hefezellen wurden mit einem Plasmid transformiert welches das Gen für eine spezielle Aminoacyl-t-RNA-Synthetase kodiert. Diese katalysiert die Synthese des Crosslinkers pBPA an eine t-RNA, welche ein Stop-Codon erkennt. Während der Translation erfolgt so der Einbau des Crosslinkers direkt an die Stelle der mit dem Stop-Codon ersetzen Position in Hrd1. Durch die Bestrahlung der Hefezellen mit UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm wird der Crosslinker pBPA aktiviert. pBPA reagiert mit Kohlenwasserstoffbindungen von Polypeptidketten und führt zu Quervernetzungen innerhalb eines Radius von ca. 3-4 Å. Durch Präzipitation von Epitop-markiertem Hrd1 unter denaturierenden Bedingungen lassen sich mit Hrd1 quervernetzte Proteine mit spezifischen Antikörpern im Immunoblot detektieren (**Abbildung 2-14**).



**Abbildung 2-14: Methode des zielgerichteten *in vivo* photo-crosslinkens.** Der durch UV-Licht aktivierbare Crosslinker pBPA kann für *in vivo* Experimente zielgerichtet an eine gewünschte Position eines Proteins eingebaut werden (Chen S, Schultz PG, 2007). Dazu wird eine tRNA-Synthetase in der Hefezelle produziert die pBPA spezifisch auf eine Suppressor tRNA übertragen kann. Diese tRNA erkennt das in Hefezellen selten verwendete Stopcodon TAG. Um den Crosslinker zielgerichtet an einer bestimmten Position eines Proteins einzubauen, wird an einer beliebigen Stelle des das Protein kodierenden Gens ein Codon gegen das Stopcodon TAG mutiert. Für die Expression der verschiedenen *hrd1*-Mutanten wurde ein *hrd1*-Deletionsstamm verwendet, in den die gewünschte Genvariante von *hrd1* plasmidbasiert transformiert wurde. Auch das Gen für die tRNA-Synthetase und die Suppressor tRNA wurden gemeinsam auf einem Plasmid in den *hrd1*-Deletionsstamm transformiert. Für ein *Crosslinking* Experiment mit Hrd1 wurde der *Crosslinker* pBPA (1,5 mg/ml in 1M NaOH) über Nacht (14-18 h) zu 1,5 l Hefekultur im Verhältnis 1:1000 ins Medium gegeben. Je 150 OD Zellen wurden dann für 45 min auf Eis mit UV-Licht bestrahlt und anschließend geerntet. Der Zellaufschluss erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mit einem für die folgende Immunopräzipitation geeigneten Puffer. Durch Verwendung eines HA-Epitop spezifischen Antikörpers wurde die Hrd1-Variante gefällt und im Immunoblot analysiert. Mit Hrd1 quervernetzte Proteine konnten mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.



Um eine Wechselwirkung der Hrd1-Transmembranregion mit Substraten während der Dislokation zu analysieren wurden diverse *hrd1*-Mutanten generiert um möglichst viele Aminosäuren gegen den Crosslinker pBPA auszutauschen (**Abbildung 2-15**). Da sich der Crosslinker pBPA strukturell von der Aminosäure Phenylalanin ableitet, wurde versucht ihn überwiegend für Phenylalanin oder ähnliche unpolare Aminosäuren einzusetzen. Dadurch sollten strukturelle Störungen durch den Einbau des Crosslinkers so gering wie möglich gehalten werden. Darüber hinaus wurde besonderes Augenmerk auf die Hrd1-Region der postulierten Helix 3 und 4 gelegt, da für den Bereich der ersten und zweiten sowie der fünften und sechsten Helix frühere Beobachtungen darauf hinweisen, dass diese eher weniger für den Substratabbau verantwortlich sind bzw. auch am Abbau membrangebundener Substrate involviert zu sein scheinen (Sato *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2010)

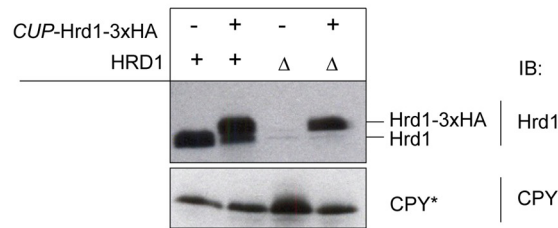


**Abbildung 2-15: Positionen von Hrd1 in die der Crosslinker pBPA integriert wurde.** Aminosäuresequenz von Hrd1 mit Kennzeichnung der postulierten Transmembranomänen (grau unterlegte Bereiche und rote Boxen) sowie der RING Finger Domäne (grüne Box). Schwarze Pfeile zeigen auf die Aminosäuren an deren Stelle jeweils der Crosslinker pBPA mit Hilfe einer spezifischen tRNA, welche mit dem Crosslinker beladen war, eingebaut wurde. Dazu wurden entsprechende Einzelmутanten von *hrd1* generiert bei denen das gewünschte Codon durch das Stop-Codon TAG ersetzt wurde. Dieses Stop-Codon wurde von der mit pBPA beladenen tRNA erkannt.

## 2.2.2 Produktion und Stabilität der mit pBPA-markierten Hrd1-Varianten

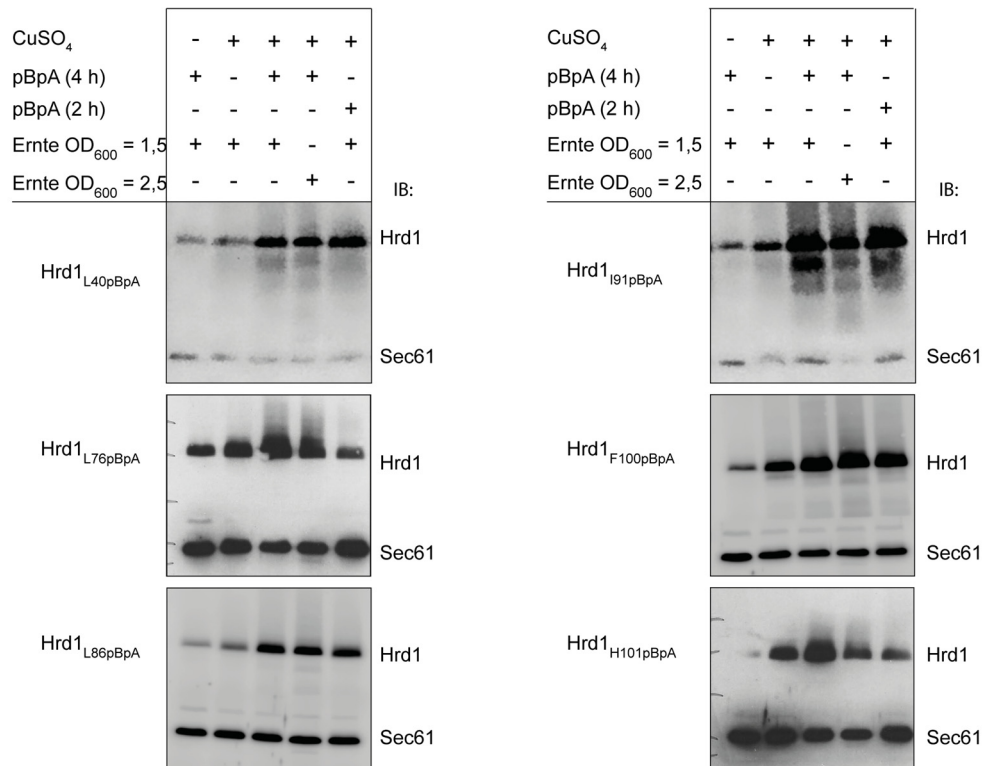
Zur Durchführung von Crosslinking-Experimenten mit Hrd1 musste dieses mit einem Epitop markiert werden und sollte zur Anreicherung des Proteinmaterials überexprimiert werden. Als Grundlage für die weiteren Crosslinking-Experimente diente daher ein Plasmid codiertes CUP-Hrd1(-3xHA)-Konstrukt, welches unter der Kontrolle eines, über eine Basisexpression hinaus induzierbaren CUP1-Promotors stand. Die Produktion und Funktionalität der daraus resultierenden Hrd1-Variante wurde zunächst durch Analyse eines Hefezelllysates eines CPY\*-produzierenden Stammes überprüft (**Abbildung 2-16**).





**Abbildung 2-16: Produktion und Funktion des verwendeten *CUP-HRD1(-3xHA)* Konstrukts.** Es wurde die Produktion des am COOH-Terminus mit einem 3fach HA-Epitop markierten Hrd1 sowie dessen Funktionalität für den Abbau des luminalen ERAD Substrats CPY\* mit der des wildtypischen Hrd1 verglichen. Dazu wurde das *CUP-Hrd1(-3xHA)* Konstrukt plasmidbasiert in einen *hrd1*-Deletionsstamm transformiert. Zum Vergleich diente ein Stamm mit genomisch integriertem *HRD1*. Die Zellen wurden durch NaOH-basierte Lyse aufgeschlossen und die Produktion von Hrd1-3xHA sowie die Menge an verbleibendem CPY\* im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

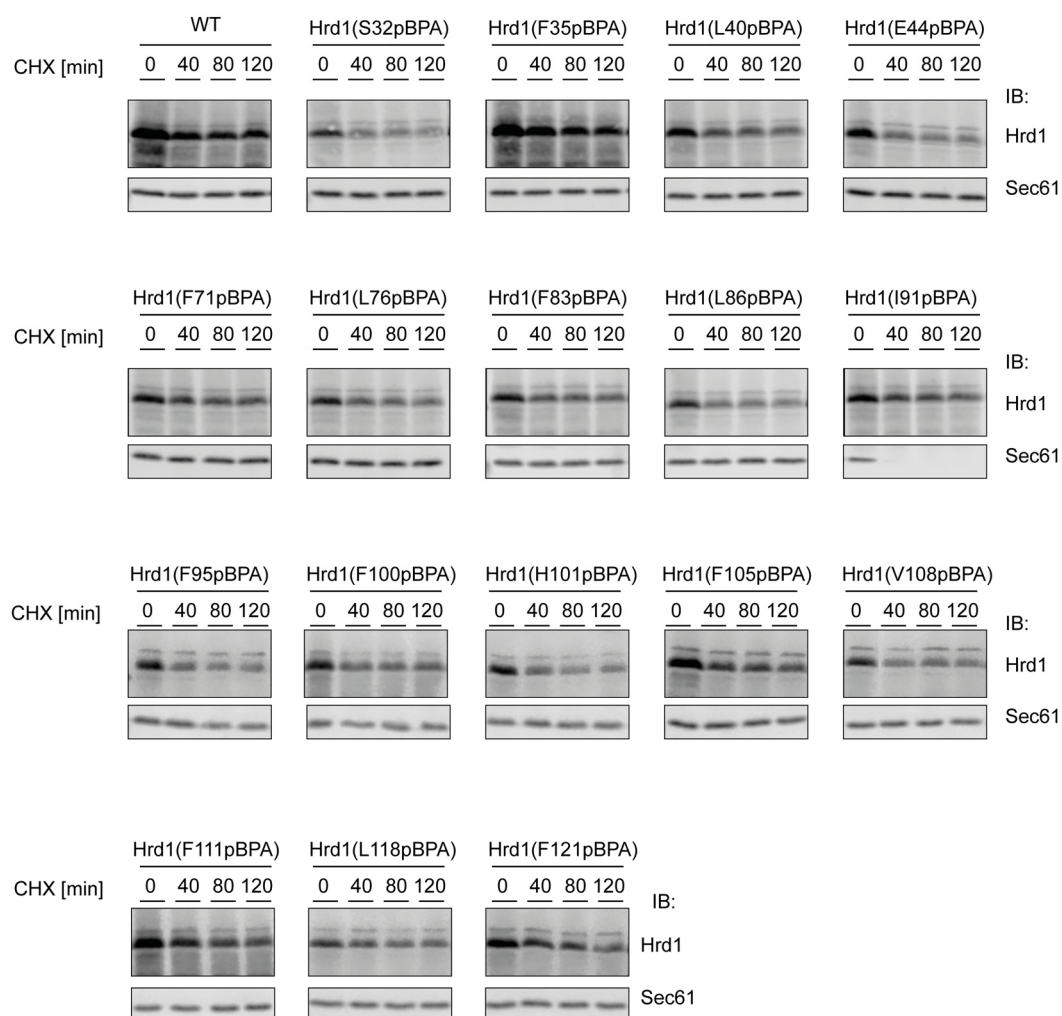
In einem nächsten Schritt wurden mittels Quick Change PCR diverse Hrd1-Konstrukte erzeugt, wobei jeweils eines der für die in **Abbildung 2-15** hervorgehobenen Aminosäuren verantwortlichen Codons durch das Stop-Codon TAG ersetzt wurde. Jedes dieser Hrd1-Konstrukte wurde zusammen mit dem für die t-RNA-Synthetase codierenden Plasmid in einen *hrd1*-Deletionsstamm transformiert. In einem zweiten Schritt wurde die Produktion der pBPA-markierten Hrd1-Varianten überprüft. Es wurde die Menge an gebildetem Hrd1 sowohl in Abhängigkeit von einer CuSO<sub>4</sub>-Induktion des Promotors sowie in Abhängigkeit der pBPA-Zugabe zu verschiedenen Wachstumsphasen der Hefekultur im Immunoblot mit einem spezifischen Hrd1-Antikörper analysiert. Die größte Menge an detektierbarem Hrd1 wurde bei Induktion des Promotors, bei Zugabe des Crosslinkers sowohl 18 h vor der Ernte als auch erneut 4 h vor der Ernte und bei Ernte der Hefekultur bei einer OD<sub>600</sub> von 1,5 erzielt (**Abbildung 2-17**). Für die weiteren *Crosslinking*-Experimente wurden diese Bedingungen bis auf die zweite Zugabe des Crosslinkers beibehalten. Zur Vereinfachung der experimentellen Vorgehensweise erfolgte die zweite Zugabe des Crosslinkers jedoch ca. 2 h vor der Ernte zeitgleich mit der CuSO<sub>4</sub>-Induktion. Die Menge an gebildetem Hrd1 wurde dadurch bei den meisten Hrd1-Varianten nur unwesentlich beeinflusst.



**Abbildung 2-17: Die Verfügbarkeit des Crosslinkers pBPA beeinflusst die Produktion der Hrd1(pBPA-3xHA)-Varianten.** Verglichen wurden verschiedene Bedingungen zur Produktion von Hrd1 mit inkorporiertem pBPA. Dazu wurde ein *hrd1*-Deletionsstamm mit verschiedenen, exemplarisch ausgewählten *CUP-hrd1(XX/pBPA-3xHA)* Plasmiden transformiert (XX steht hierbei für die entsprechende Aminosäure die durch pBPA ersetzt wurde). Für das Experiment wurde eine Übernachtskultur der Zellen angeimpft, aus der am nächsten Morgen Zellen für die Hauptkultur entnommen wurden. Die in Selektionsmedium wachsenden Zellen wurden 2 h vor der Ernte mit 1 mM CuSO<sub>4</sub> versetzt und entweder bei einer OD<sub>600</sub> von 1,5 oder bei einer OD<sub>600</sub> von 2,5 geerntet. Die Zugabe des Crosslinkers erfolgte bei allen Zellen zunächst 18 h vor der Ernte und dann erneut entweder 4 h vor der Ernte, nur 2 h vor der Ernte oder kein weiteres Mal. Die Zellen wurden mittels NaOH-basierter Lyse aufgeschlossen und äquivalente Mengen von ca. 0,01 OD<sub>Zellen</sub>/Tasche im Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Detektion der produzierten Hrd1-Mengen erfolgte im Immunoblot mittels spezifischem Antikörper. Als Referenzprotein für die Gelbeladung diente das Sec61-Signal.

Neben der Optimierung der Hrd1-Produktion sollte auch die Stabilität der verschiedenen pBPA-markierten Hrd1-Varianten überprüft werden. Dazu wurden Cycloheximid-Abbauexperimente mit den pBPA-markierten Hrd1 Varianten durchgeführt. Die Auswertung dieser Experimente im Immunoblot ergab zum Einen dass die Menge an produziertem Hrd1 in Abhängigkeit der Position an der der *Crosslinker* eingebaut wird sehr zu variieren scheint. Zum Anderen wurde ein deutlicher Abbau sowohl des wildtypischen Hrd1 als auch der pBPA-markierten Hrd1-Varianten vom ersten zum zweiten Zeitpunkt hin festgestellt (**Abbildung 2-18**). Die so erhaltene, reduzierte Hrd1-Menge blieb dann aber über die restlichen Zeitpunkte stabil. Der zu Beginn beobachtete Abbau von Hrd1 scheint aus der Überproduktion durch Überexpression von *HRD1* zu resultieren. Da Hrd1 in Abwesenheit von Hrd3 instabil ist, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass für einen bestimmten Anteil der Hrd1-Proteine nicht genügend Hrd3-Proteine in der Zelle vorhanden sind. Nach der Rückkehr zu einem basalen Niveau bleibt das Hrd1-Protein stabil. Dies wurde sowohl für Wildtyp Hrd1 als auch für die pBPA-markierten Hrd1-

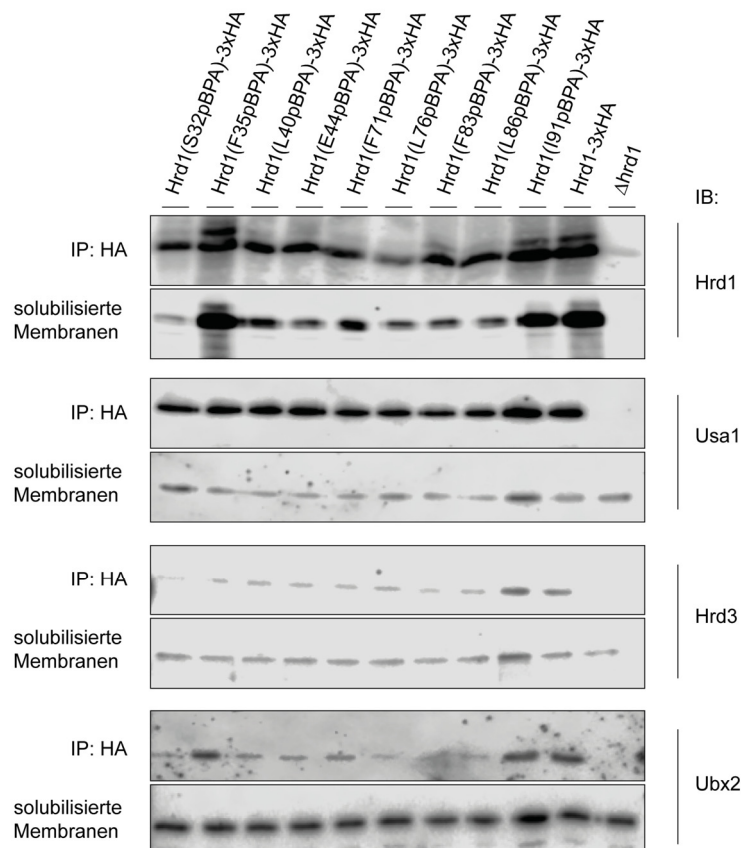
Varianten beobachtet (**Abbildung 2-18**). Damit ist davon auszugehen, dass durch den Einbau des Crosslinkers die Stabilität von Hrd1 nicht beeinflusst wird.



**Abbildung 2-18: Das eingebaute pBPA beeinflusst die Stabilität von Hrd1(pBPA-3xHA) nicht.** Cycloheximid-Experiment zur Analyse der Stabilität verschiedener, exemplarisch ausgewählter Hrd1-Varianten die den Crosslinker pBPA incorporiert haben. Eine Übernachtskultur der Zellen in Selektionsmedium wurde angesetzt die am nächsten Morgen zur Inokulation der Hauptkultur diente. Die Zugabe des Crosslinkers pBPA erfolgte 18 h vor dem Start des Cycloheximid-Experiments zur Übernachtskultur und erneut 4 h vor dem Start des Cycloheximid-Experiments zur Hauptkultur. 2 h vor Beginn des Cycloheximid-Experiments wurden die Zellen mit  $\text{CuSO}_4$  induziert und bei einer  $\text{OD}_{600}$  von ca. 1 wurde das Cycloheximid-Experiment durch Zugabe von Cycloheximid gestartet. Die Stabilität der Hrd1-Varianten wurde über einen Zeitraum von 2 h analysiert und die Zellen aller Zeitpunkte am Ende mittels Glaskugelaufschluß lysiert. Zum Vergleich der Hrd1-Mengen wurden die Hrd1-Varianten im Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Das Protein Sec61 diente dabei als Referenzprotein für Zellaufschluß und Gelbeladung.

### 2.2.3 Assoziation der pBPA-markierten Hrd1-Varianten mit der HRD-Ligase

Zur weiteren Charakterisierung der Integrität der mit pBPA-markierten Hrd1-Varianten wurde die Assemblierung ausgewählter Hrd1-Varianten mit Komponenten der HRD-Ligase in einem Ko-Immunopräzipitationsexperiment unter nativen Bedingungen untersucht. Dazu wurde eine Epitop-markierte Hrd1-Variante als Grundlage für den Einbau des Crosslinkers pBPA verwendet. Die durch QuickChange-PCR erzeugten *hrd1*(XX-pBPA)-Konstrukte wurden wie beschrieben in einen *hrd1*-Deletionsstamm transformiert, der zusätzlich die benötigte Aminoacyl-transferase plasmidbasiert produziert. Nach Fällung der Hrd1-Variante unter Verwendung eines HA-Epitop spezifischen Antikörpers, wurden mitgefällte Komponenten der HRD-Ligase im Immunoblot mittels spezifischer Antikörper detektiert. Auch in diesem Experiment zeigte sich erneut, dass die Menge an produziertem, pBPA-enthaltenem Hrd1 stark variiert (**Abbildung 2-19**). Dementsprechend wurden auch Schwankungen zwischen den Mengen der mitgefällten Proteine Hrd3, Usa1 und Ubx2 beobachtet. Jedoch konnten sowohl Usa1, als auch Hrd3 und das Cdc48-rekrutierende Ubx2 bei allen überprüften, mit pBPA modifizierten Hrd1-Varianten nachgewiesen werden (**Abbildung 2-19**). In keinem Fall schien damit die Assemblierung der HRD-Ligase durch den Einbau von pBPA vollständig gestört zu sein. Kleinere strukturelle Abweichungen lassen sich mit diesem Experiment jedoch nicht ausschließen.



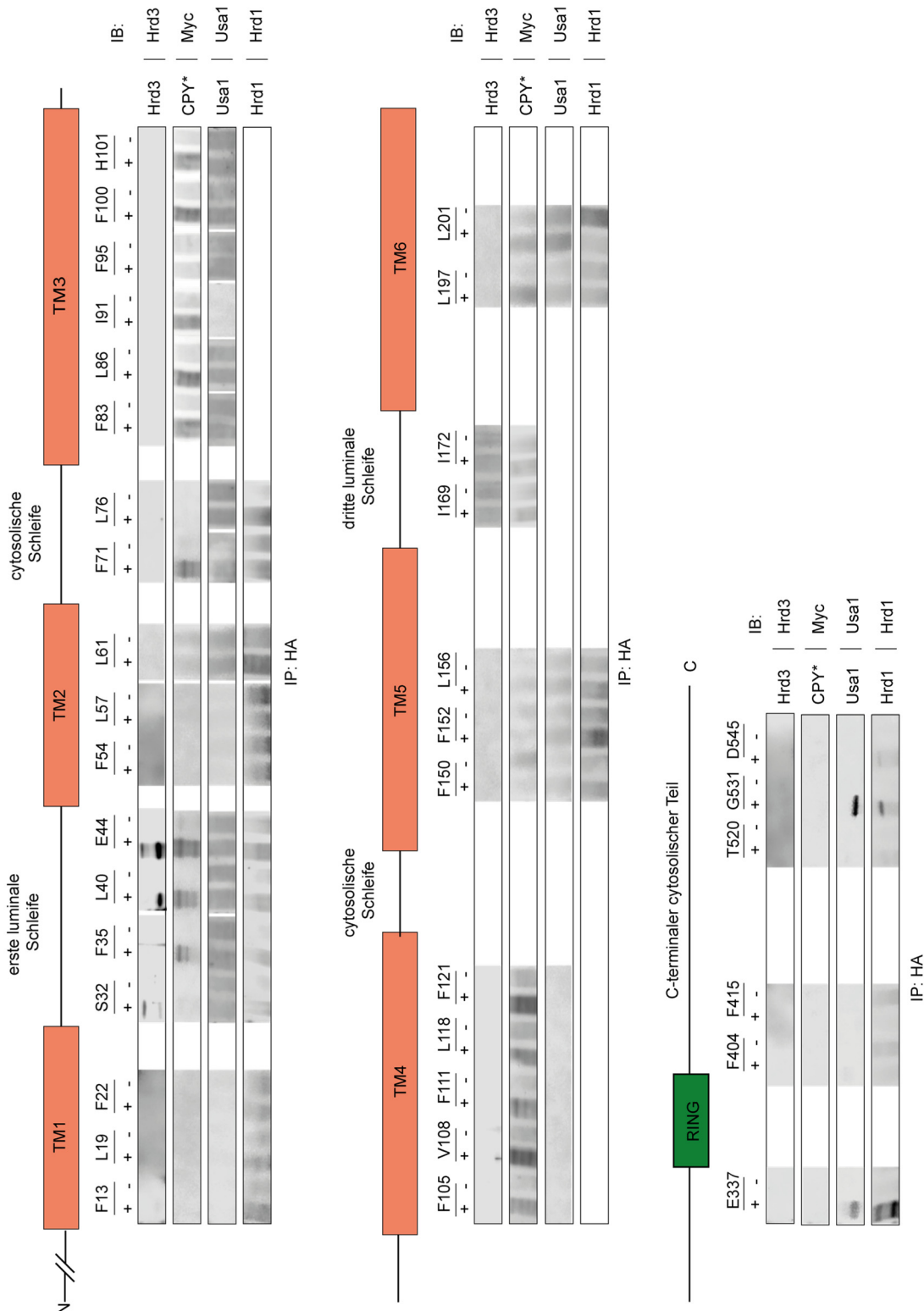
**Abbildung 2-19: Die Integration von Hrd1 in die HRD-Ligase wird durch den Einbau von pBPA nicht beeinflusst.** Ko-Immunopräzipitation von HRD-Ligaseproteinen durch verschiedene, exemplarisch ausgewählte Hrd1-Varianten. Die Plasmid-codierten *hrd1*(-3xHA)-Varianten wurden durch Zugabe von CuSO<sub>4</sub> überexprimiert. Die bezeichneten Aminosäuren zeigen den Einbau des Crosslinkers pBPA an diese Position an. Die Ko-Präzipitation der HRD-Ligaseproteine durch Fällung der Hrd1-Varianten unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurde im Immunoblot mittels spezifischer Antikörper analysiert.

### 2.2.4 Zusammenstellung der *crosslinking* Ergebnisse und Funktionalität des *crosslinking* Experiments

Um mit der Methode des *in vivo photo-crosslinkings* eine Analyse der Transmembranregion von Hrd1 hinsichtlich der räumlichen Nähe zu anderen Ligaseuntereinheiten und zum Modellsubstrat CPY\* durchzuführen wurde der Crosslinker pBPA an insgesamt 36 Positionen in Hrd1 eingebaut. Dabei wurden die verschiedenen *hrd1*-Konstrukte von einem Plasmid unter der Kontrolle eines CUP-Promotors überexprimiert. Alle Crosslinking-Experimente wurden mit einem  $\Delta hrd1$  CPY\*(-13xMyc)-Stamm durchgeführt. Zur Untersuchung möglicher Quervernetzungen zwischen Hrd1 und dem Substrat CPY\*(-13xMyc) wurde zusätzlich das Cdc48-rekrutierende Protein Ubx2 durch Gendeletion eliminiert. Dadurch sollte der Abbau des Substrats verhindert und eine vermutlich nur transiente Wechselwirkung zwischen Hrd1 und Substratmolekülen während der Dislokation intensiviert werden.

Die *Crosslinking*-Experimente wurden sowohl mit als auch ohne eine UV-Bestrahlung durchgeführt. Damit sollte die Spezifität der Signale für die gebildeten quervernetzten Proteinkomplexe verdeutlicht werden. Zudem wurde auch wildtypisches Hrd1(-3xHA) ohne eingebauten Crosslinker im *Crosslinking*-Experiment untersucht. Bei der Analyse dieser Proben im Immunoblot konnten keine Signale detektiert werden, die auf eine unspezifische Reaktion der verwendeten Antikörper für die HRD-Ligasekomponenten sowie für das Substrat hindeuteten.

In ersten Crosslinking-Experimenten wurde die räumliche Nähe zwischen Hrd1 und dessen Interaktionspartnern Hrd3 und Usa1 sowie zwischen Hrd1 und dem Substrat CPY\*(-13xMyc) untersucht. Eine Übersicht der analysierten Proben im Immunoblot mittels spezifischer Antikörper für Hrd3, Usa1 und das Myc-Epitop zeigt **Abbildung 2-20**. Wie dieser Abbildung zu entnehmen ist, konnten nur sehr wenige Quervernetzungen innerhalb der Transmembranregion von Hrd1 zu den untersuchten Proteinen festgestellt werden. Sehr deutliche, intensive Signale wurden lediglich innerhalb der ersten luminalen Schleife für die Positionen Hrd1<sub>L40</sub> und Hrd1<sub>E44</sub> mit dem Hrd3-spezifischen Antikörper detektiert. Dies bestätigt frühere Beobachtungen genetischer Experimente in denen die Bedeutung der Region der ersten und zweiten Transmembranhelix von Hrd1 für eine Wechselwirkung mit Hrd3 gezeigt wurde. Außerdem stehen die identifizierten Quervernetzungen zwischen Hrd1 und Hrd3 im Einklang mit dem Cryo-EM Modell des Hrd1-Hrd3 Komplexes und unterstützen damit die räumliche Nähe beider Proteine auch *in vivo*. Neben den erhaltenen Signalen durch den Hrd3-Antikörper wurden vereinzelt auch sehr schwache und viel diffusere Signale mit dem Myc-Epitop spezifischen Antikörper erhalten, die auf eine räumliche Nähe zwischen Hrd1 und dem Substrat CPY\* deuten könnten. Aufgrund der zu schwachen Signale wurden daraufhin eine Reihe von Optimierungen ausgetestet die in **Tabelle 2-1** genauer beschrieben sind. In der in den *Crosslinking*-Experimenten untersuchten Transmembranregion von Hrd1 konnten keine Hinweise auf eine räumliche Nähe zum Strukturprotein Usa1 gefunden werden. Jedoch wurden quervernetzte Usa1-Proteine innerhalb des zytosolischen Bereichs von Hrd1 für die Positionen E337 und G531 detektiert (**Abbildung 2-20**). Da sich im Bereich von Hrd1<sub>517-551</sub> auch die Bindungsregion von Hrd1 für Usa1 befindet belegt die Quervernetzung beider Proteine an der Position Hrd1<sub>G531</sub> das die Methodik geeignet ist, räumliche Nähe zwischen Proteinen darzustellen.

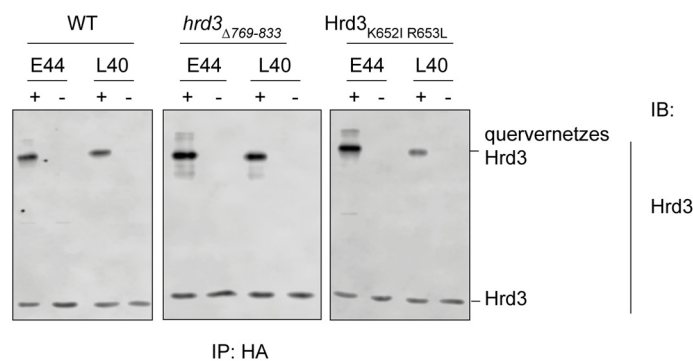


**Abbildung 2-20: Hrd1-3xHA bildet an verschiedenen Positionen Quervernetzungen zu anderen HRD-Ligase Komponenten und zum Substrat CPY\* aus.** *hrd1*-Deletionszellen die Epitop-markiertes CPY\*-13xMyc produzierten wurden mit den Plasmid-codierten *hrd1*(XX/pBPA-3xHA)-Konstrukten transformiert. Zur Analyse von Quervernetzungen zu CPY\*-13xMyc wurde zusätzlich das für das Cdc48-rekrutierende Protein Ubx2 codierende Gen deletiert. Zur Aktivierung des incorporierten *crosslinkers* wurden die Zellen für 45 min bei 4 °C mit UV-Licht bestrahlt und anschließend die Hrd1(XX/pBPA-3xHA)-Varianten unter nicht-denaturierenden Bedingungen mittels HA-Epitop spezifischem Antikörper präzipitiert. Die Analyse der mit Hrd1 *gecrosslinkten* Komponenten der HRD-Ligase erfolgte durch spezifische Antikörper im Immunoblot.



### 2.2.5 Die erste luminal Schleife von Hrd1 bildet Quervernetzungen zur luminalen Domäne von Hrd3 und Hrd3<sub>KR</sub> aus

Um die beobachtete räumliche Nähe zwischen der ersten luminalen Schleife von Hrd1 und Hrd3 genauer zu charakterisieren, wurden weitere *photo-crosslinking* Experimente mit Hrd3 Varianten durchgeführt. Mit einer um den Membrananker verkürzten Hrd3-Variante sollte geklärt werden, ob die Quervernetzung wie erwartet zur luminalen Domäne von Hrd3 ausgebildet wird. Wie aus **Abbildung 2-21** hervorgeht, wurde diese Annahme durch das *crosslinking* Experiment unter Verwendung eines *hrd3*<sub>Δ769-833</sub> exprimierenden Stammhintergrunds bestätigt. Hrd3<sub>Δ769-833</sub> ist eine um den Membrananker verkürzte Variante von Hrd3. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob die den Substratabbau hemmende Hrd3-Variante, Hrd3<sub>K652I R653L</sub> (Mehnert *et al.*, 2015), eine veränderte räumliche Nähe zur ersten luminalen Domäne von Hrd1 aufweist. Dazu wurde die Hrd3<sub>K652I R653L</sub>-Variante ebenfalls im *Crosslinking* Experiment untersucht. Es zeigte sich, dass sich die beobachteten Quervernetzungen zwischen Hrd1 und Hrd3<sub>K652I R653L</sub> etwas vom Wildtyp unterscheiden. Eine leichte Abschwächung des, durch den Hrd3-Antikörper detektierten Signals im Immunoblot ließ sich vor allem für die Position Hrd1<sub>L40</sub> erkennen (**Abbildung 2-21**). Dies deutet darauf hin, dass die räumliche Orientierung zwischen Hrd1 und Hrd3<sub>K652I R653L</sub> leichte Veränderungen aufweist. Da das Hrd3 Protein als Substratrezeptor der HRD-Ligase fungiert und davon ausgegangen wird, dass Substratmoleküle vom Rezeptor an die weiteren membranständigen Komponenten gelangen müssen, könnte eine veränderte räumliche Orientierung zwischen Hrd1 und Hrd3 im luminalen Bereich auf eine gestörte Substratübergabe hindeuten und somit den bekannten hemmenden Effekt der Hrd3<sub>K652I R653L</sub>-Variante auf den Substratabbau erklären.



**Abbildung 2-21: Positionen der ersten luminalen Schleife von Hrd1(XX/pBPA-3xHA) bilden Quervernetzungen zur luminalen Domäne von Hrd3 und Hrd3<sub>KR</sub> aus.** *hrd1*-Deletionszellen die entweder eine um den Membrananker gekürzte Variante des Hrd3 Proteins (Hrd3<sub>Δ769-833</sub>) oder eine den Substratabbau beeinflussende Variante des Hrd3 Proteins (Hrd3<sub>K652I R653L</sub>) produzierten, wurden mit Plasmid-codiertem *hrd1*(E44/pBPA-3xHA) bzw. *hrd1*(L40/pBPA-3xHA) transformiert. Zur Analyse der Crosslinking-Reaktionen zwischen den in der ersten luminalen Schleife mit pBPA markierten Hrd1-Varianten und den Hrd3-Varianten erfolgte eine Immunopräzipitation von Hrd1(XX/pBPA-3xHA) mittels HA-Epitop spezifischem Antikörper unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Eine Veränderung der Crosslinking-Reaktionen wurde im Immunoblot mittels Hrd3-spezifischem Antikörper analysiert.

### 2.2.6 Quervernetzungen zwischen Hrd1 und dem ERAD-Substrat CPY\* innerhalb der Membranregion lassen sich nicht eindeutig darstellen

Das größte Ziel welches mit der Durchführung der *in vivo photo-crosslinking* Experimente verbunden war, war eine räumliche Nähe zwischen den integralen Membranabschnitten von Hrd1 und Substratmolekülen beobachten zu können. Denn damit ließe sich die Rolle der Hrd1-Transmembranregion bei der Dislokation von Substraten aus dem ER-Lumen in einer *in vivo* Situation analysieren. Dass die gewählte Methodik generell für diese Fragestellung geeignet ist, konnte bereits in einer früheren Arbeiten zum Der1 Protein in der Arbeitsgruppe von Prof. Sommer gezeigt werden (Mehnert, 2013; Mehnert *et al.*, 2014). Jedoch wurde bereits in diesen Arbeiten festgestellt, dass es wesentlich schwieriger ist Quervernetzungen zu Substratmolekülen als zu anderen Komponenten der HRD-Ligase im *Crosslinking* Experiment zu bilden. Im Gegensatz zu dem vermutlich eher statischen HRD-Ligasekomplex sind die Wechselwirkungen des Substrats mit der HRD-Ligase während der Dislokation vermutlich eher transienter Natur. Um die Wahrscheinlichkeit der Quervernetzung von Hrd1 mit Substratmolekülen zu erhöhen wurde deshalb wie bereits beschrieben mit einem im Abbau inhibierten Hefestamm gearbeitet, bei dem die für den zytosolischen Teil des Abbaus erforderliche AAA<sup>+</sup>-ATPase Cdc48 nicht mehr richtig zur HRD-Ligase rekrutiert werden konnte.

Wie in der Übersicht in **Abbildung 2-20** dargestellt ist, ließen sich damit sehr schwache Signale im Immunoblot als Hinweis auf eine Quervernetzung zwischen Hrd1 und dem verwendeten Substrat CPY\* detektieren. Am deutlichsten konnten Quervernetzungen zwischen CPY\* und Hrd1 in der ersten luminalen Schleife von Hrd1 nachgewiesen werden. Für die Positionen innerhalb der Membranhelices von Hrd1 ist es auf Grund der geringen Signalintensität der quervernetzten Proteine im Immunoblot nicht gelungen, die Beobachtungen in Folgeexperimenten zu verifizieren. Daher wurde durch verschiedene methodische Veränderungen versucht, die Intensität der Crosslinking-Signale zu erhöhen (**Tabelle 2-1**). Neben Veränderungen die zur Erhöhung der *Crosslinking*-Effizienz beitragen sollten wurde die Probenanalyse durch den Immunoblot angepasst und genetische Veränderungen des Hefestammhintergrundes, des tRNA-Synthetase kodierenden Plasmids sowie der für die Substratexpression verwendeten Konstrukte durchgeführt.

Wie bereits beschrieben, wurden die Crosslinking-Experimente zur Detektion der räumlichen Nähe zum Substrat in einem *ubx2*-Deletionsstammhintergrund durchgeführt. Da der genaue Mechanismus der Substrat-Dislokation jedoch noch unbekannt ist und früheren Beobachtungen auch entnommen werden könnte, dass bei Eliminierung der zytosolischen Komponenten des ERAD-Abbauweges eine Anreicherung von Substraten bereits im ER-Lumen, ohne Übertritt in den Membranbereich erfolgen könnte, wurden die Crosslinking-Experimente auch in Anwesenheit von Ubx2 wiederholt. Da unter diesen Bedingungen das durch Überexpression erhaltene, überschüssige Hrd1 instabil ist, wurde der Effekt einer gleichzeitigen Hrd3-Überexpression auf die Stabilität von Hrd1 analysiert. Es zeigte sich, dass dadurch die Menge an Hrd1 erhöht werden konnte (**Abbildung 2-22**). Eine Verbesserung der Quervernetzungsreaktionen zwischen Hrd1 und dem Substrat konnte allerdings auch dadurch nicht erzielt werden.



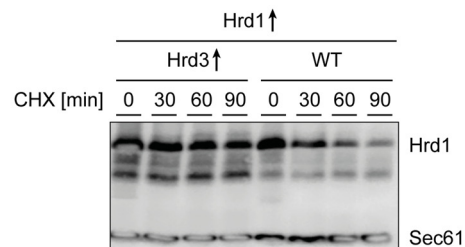
**Tabelle 2-1: Zusammenfassung der methodischen Veränderungen zur gezielten Verbesserung der Quervernetzungen zwischen Hrd1(XX/pBPA-3xHA) und dem Substrat CPY\*.**

(+ = Verbesserung, - = Verschlechterung, / = ohne Auswirkung)

Alte Herangehensweise	Neue Herangehensweise	Auswirkung
<b>SDS-PAGE &amp; Western Blot</b>		
Methanol-haltiger Blotting Puffer	Blotting Puffer ohne Methanol	+
Blottdauer 60 min.	Blottdauer bis 120 min.	/
9 % Polyacrylamidgele	6 % Polyacrylamidgele	/
Blocken mit Milchpulver	Blocken mit Rotiblock oder BSA	/
<b>Probenaufbereitung</b>		
150 OD <sub>600</sub> Zellen in 50 µl Probenpuffer aufnehmen	150 OD <sub>600</sub> Zellen in 20 µl Probenpuffer aufnehmen	+
<b>Kultivierung der Hefen</b>		
einmalige Crosslinkerzugabe	zweimalige Crosslinkerzugabe	+
UV-Bestrahlung in Ruhe	Rotationsschüttler für UV-Bestrahlung	-
<b>Geräte</b>		
gebrauchte UV-Lampe	neue UV-Lampe	/
<b>Antikörper und Chemikalien</b>		
Myc-Antikörper (Maus; Sigma)	diverse andere Myc-Antikörper	-
Crosslinker pBPA	verschiedene Herstellungschargen	/
<b>Substrate</b>		
CPY*-13xmyc	CPY*(8Met.....)-13xmyc	/
	CPY*	/
	CUP-PrA*-myc	-
<b>genetische Manipulationen</b>		
alle HRD-Ligase Gene exprimiert	Deletion von <i>ubx2</i> , Expression von <i>ubc7C89S</i>	+
normale Hrd3-Expression	Überexpression von Hrd3	/
pGK1-pBPA-Expressionsplasmid	pSNR-pBPA-Expressionsplasmid	-
ausgewählte Hrd1-Positionen	weitere Hrd1-Positionen für pBPA-Einbau	/
für pBPA-Einbau	anhand publizierter EM-Struktur (Schoebel <i>et al.</i> 2017)	

Das als Substrat verwendete CPY\* ist das am besten charakterisierte luminal Substrat hinsichtlich seines Abbaus über den ERAD-Degradationsweg. Auch die im Crosslinking-Experiment verwendete mit einem 13fachen Myc-Epitop markierte Variante des CPY\* wurde bereits in früheren Studien verwendet. Durch die Epitop-Markierung können die quervernetzten Substratproteine im Immunoblot mit einem Epitop-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden der eine höhere Sensitivität gegenüber dem CPY\*-spezifischen Antikörper aufweist. Beim Vergleich des Hrd1-abhängigen Abbaus zwischen dem nicht-Markierten und dem Epitop-Markierten fiel jedoch auf, dass das verwendete 13fache Myc-Epitop den Abbauweg des CPY\* in der Zelle verändert. Die für CPY\* charakteristische Glykosylierung verursacht durch dessen Zirkulation zwischen ER und GOLGI kann für CPY\*(-13xMyc) nicht detektiert werden und es scheint auch in Abwesenheit von Hrd1 zu einem Abbau dieses Substrates zu kommen. Daher lässt sich nicht ausschließen, dass es auch in Anwesenheit von Hrd1 einen parallelen-unabhängigem Abbauweg für CPY\*(-

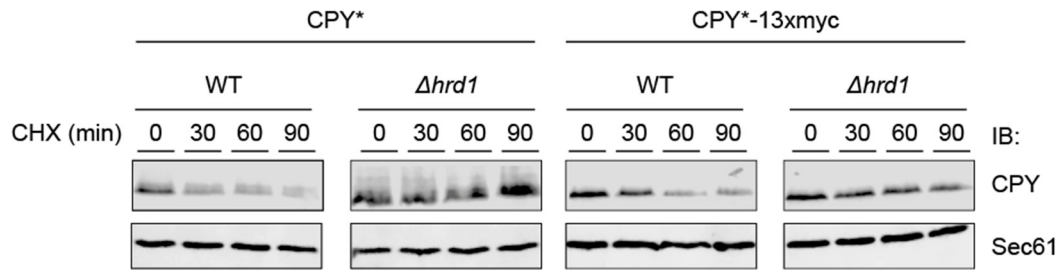
13xmyc) gibt (**Abbildung 2-23**). Da ein paralleler Abbauweg zu einem verminderten Abbau über die HRD-Ligase führen würde, wurde neben CPY\*(-13xmyc) auch CPY\* selbst sowie das alternative ERAD-Substrat PRA\* im *Crosslinking* Experiment eingesetzt. In keinem der Fälle wurden jedoch Verbesserungen in den Quervernetzungsreaktionen erzielt.



**Abbildung 2-22: Die gleichzeitige Überexpression von Hrd3 und Hrd1 verhindert den Abbau von überschüssigem Hrd1.** Cycloheximid-Experiment zur Analyse des Einflusses von überexprimiertem Hrd3 auf die Stabilität von überexprimiertem Hrd1. *hrd1*-Deletionszellen die entweder *HRD3* oder *TEV-hrd3* exprimierten wurden mit Plasmid-kodiertem *CUP-hrd1(-3xHA)* transformiert. Der Abbau von Hrd1(-3xHA) innerhalb von 90 min wurde im Immunoblot mittels Hrd1-spezifischem Antikörper analysiert. Als Referenz für den Zellaufschluß und die Gelbeladung diente Sec61.

Da beschrieben ist, dass der verwendete *Crosslinker* pBPA eine erhöhte Reaktivität gegenüber der Aminosäure Methionin aufweist, wurde außerdem versucht, die Quervernetzung zwischen Hrd1 und dem Substrat CPY\* zu verbessern indem zusätzlich zu den vorhandenen Methioninen acht weitere Methione eingebaut wurden. Nachdem für dieses Substrat ein Hrd1-abhängiger Abbau bestätigt wurde, wurde es ebenfalls im *Crosslinking*-Experiment mit Hrd1 eingesetzt. Eine Verbesserung der *Crosslinking* Ergebnisse blieb jedoch auch mit diesem modifiziertem Substrat aus.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass sich die Methodik des *in vivo photo-crosslinkings* angewandt für Hrd1 als schwierig erwiesen hat, um eine räumliche Nähe zwischen Hrd1 und Substratmolekülen zu analysieren. Entweder waren die hin und wieder beobachteten Quervernetzungen zwischen der Hrd1-Transmembranregion und dem Substrat unspezifischer Natur weil die Dislokation der Substrate nicht über Hrd1 erfolgt oder die Effizienz des *Crosslinkings* unter den gewählten Bedingungen war zu gering um ausreichend quervernetztes Material zu erhalten.

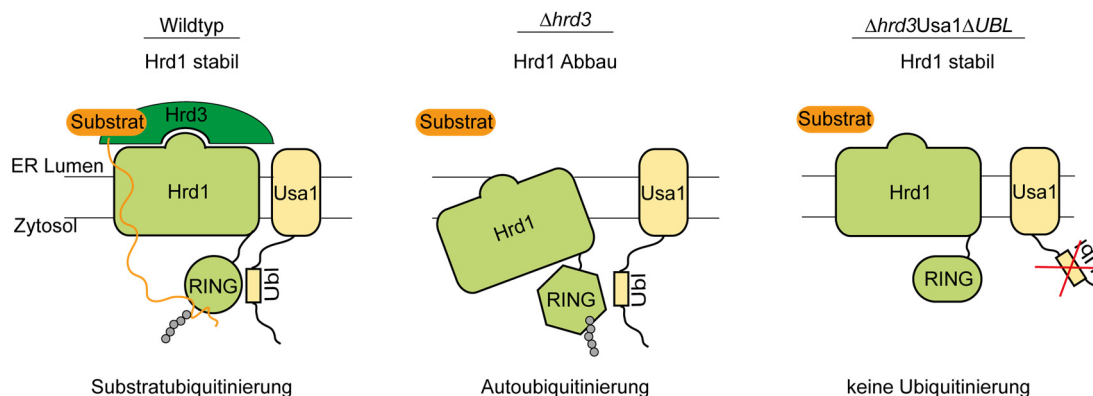


**Abbildung 2-23: Epitop-markiertes CPY\* wird auch Hrd1-unabhängig abgebaut.** Cycloheximid-Experiment zur vergleichenden Analyse des Abbaus von CPY\* gegenüber CPY\*-13xMyc durch Hrd1. Im Experiment wurde der Abbau von genomisch exprimiertem CPY\* mit dem von genomisch exprimiertem CPY\*-13xmyc zwischen einem *HRD1*-Stammhintergrund und einem *hrd1*-Deletionsstamm verglichen. Die Detektion beider Substratspezies erfolgte mittels spezifischem CPY\*-Antikörper im Immunoblot. Als Ladekontrolle diente das Sec61.

## 2.3 Weiterführende Charakterisierung des Mechanismus zur Regulation der Hrd1 Stabilität

### 2.3.1 Die Stabilität von Hrd1 wird durch Hrd3 und Usa1 beeinflusst

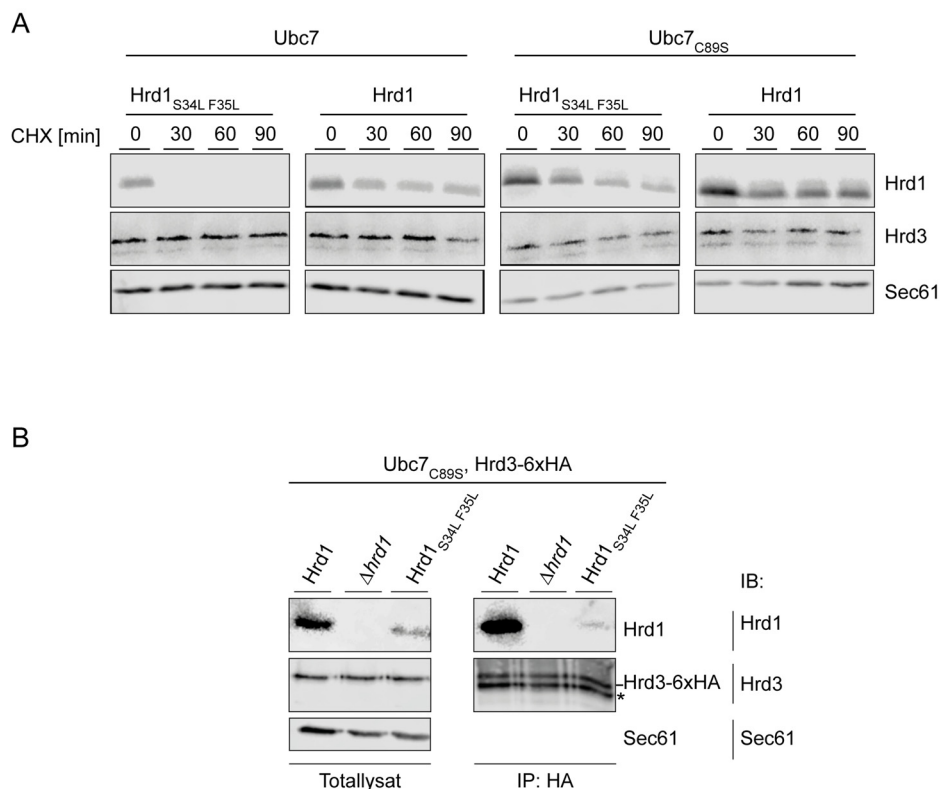
Aus den Ergebnissen der beiden vorangegangenen Abschnitte eröffneten sich weitere Fragestellungen, die die Regulation des Abbaus von Hrd1 selbst betrafen. In **Abbildung 2-24** ist grafisch zusammengefasst, was bisher über die Degradation von Hrd1 bekannt ist. Zum Einen führt die Abwesenheit von Hrd3 zum Abbau von Hrd1 (Gardner *et al.*, 2000). Verantwortlich dafür ist die Autoubiquitinierung der Hrd1-RING-Domäne. Zum Anderen setzt es die Anwesenheit der UBL-Domäne des Usa1 Proteins voraus, denn in Abwesenheit dieser Ubiquitin-ähnlichen Domäne kann keine Autoubiquitinierung von Hrd1 mehr beobachtet werden (Carroll & Hampton, 2010; Vashistha, Neal, Singh, Carroll, & Hampton, 2016). Welche genauen Regulationsmechanismen hinter diesen Beobachtungen stecken ist bisher unbekannt. Auch die Frage, ob unter bestimmten physiologischen Bedingungen ein gezielter Abbau der HRD-Ligase induziert werden kann wurde noch nicht näher analysiert. Damit könnte jedoch die erhöhte Menge an HRD-Ligasekomplexen in der Zelle nach einer UPR-Reaktion wieder an eine normalisierte zelluläre Situation angepasst werden.



**Abbildung 2-24: Hrd3 und Usa1 haben Einfluss auf die Stabilität und Funktion von Hrd1.** Zusammenfassung bekannter Beobachtungen über die Auswirkung einer *hrd3*-Deletion und einer Deletion der UBL-Region von *usa1*. A) In Anwesenheit von Hrd3 und Usa1 kann eine Substratubiquitinierung mit Hilfe der RING-Domäne von Hrd1 erfolgen. B) In Abwesenheit von Hrd3 kommt es zur Autoubiquitinierung von Hrd1, auch in *trans*, und damit zum Abbau des Hrd1 Proteins. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein der UBL-Domäne von Usa1. C) Fehlt zusätzlich zur Situation in B) die UBL-Domäne von Usa1 so erfolgt keine Ubiquitinierungsreaktion mehr und Hrd1 bleibt stabil.

In den *Crosslinking*-Experimenten wurde die räumliche Nähe zwischen der ersten luminalen Schleife von Hrd1 und Hrd3 gezeigt. Darauf aufbauend wurden Hrd1-Varianten erzeugt, die eine Aminosäuresubstitution innerhalb der ersten luminalen Schleife von Hrd1 aufwiesen. Diese wurden hinsichtlich ihrer Stabilität im Cycloheximid-Abbauxperiment genauer untersucht und letztendlich eine Hrd1-Variante mit zwei aufeinanderfolgenden Aminosäuresubstitutionen identifiziert die einem starken Abbau

unterlag. Es zeigte sich wie erwartet, dass der Abbau dieses Hrd1<sup>S34L, F35L</sup>-Proteins von dem E2-Enzym Ubc7 abhängig ist, da es in einem Hefestamm der eine katalytisch inaktive Form des E2s produziert zu einer deutlichen Stabilisierung von Hrd1<sup>S34L, F35L</sup> im Cycloheximid-Abbauxperiment kam (**Abbildung 2-25 A**). Eine Ko-Immunopräzipitation unter nicht-denaturierenden Bedingungen sollte die Vermutung bestätigen, dass der Abbau von Hrd1<sup>S34L, F35L</sup> aus dem Verlust der Interaktion mit dem Bindungspartner Hrd3 herrührt. Für diese Ko-IP wurde ein *hrd1*-Deletionsstammhintergrund verwendet, bei dem die Mutante *HRD1*<sup>S34L, F35L</sup> in den URA3-Locus integriert wurde, der eine Epitop-markierte Hrd3-Variante sowie die katalytisch inaktive Varianten Ubc7<sup>C89S</sup> produzierte. Wie der **Abbildung 2-25 B** zu entnehmen ist, konnte weniger Hrd1 mit Hrd3-6xHA gefällt werden, wenn es sich um die Hrd1-Variante Hrd1<sup>S34L, F35L</sup> anstatt um den Wildtyp handelte. Die Annahme, dass dem Abbau von Hrd1<sup>S34L, F35L</sup> ein Verlust der Bindung zu Hrd3 zugrunde liegt, konnte damit bestätigt werden.

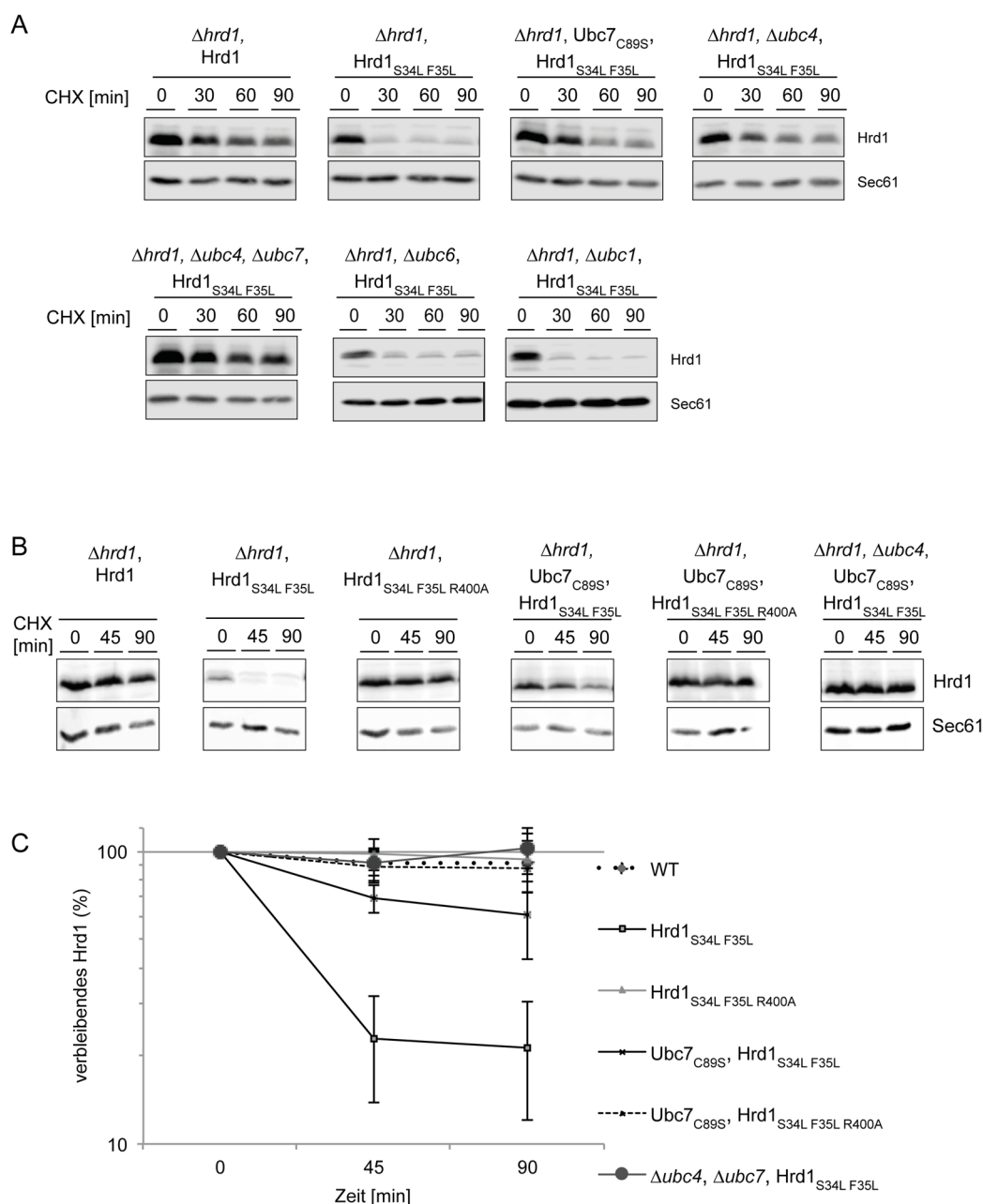


**Abbildung 2-25: Zwei Aminosäureänderungen in der ersten luminalen Schleife von Hrd1 führen zum Verlust der Interaktion mit Hrd3.** A) Cycloheximid-Abbauxperiment zur Analyse der Stabilität von Hrd1<sup>S34L, F35L</sup> im Vergleich zu Hrd1. Es wurden zwei *hrd1*-Deletionsstämme verwendet, wobei der eine Ubc7 und der andere eine katalytisch inaktive Variante des am Hrd1-Abbau beteiligten E2-Enzyms, Ubc7(C89S), produzierte. In diese Stämme wurde *HRD1* bzw. *HRD1*<sup>S34L, F35L</sup> Plasmid-basiert transformiert. Der Abbau der Hrd1-Varianten wurde über 90 min nach Zugabe von Cycloheximid verfolgt. B) Ko-Immunopräzipitation von Hrd1 durch Hrd3 unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Die verwendeten *hrd1*-Deletionszellen produzierten die katalytisch inaktive E2-Enzymvariante Ubc7(C89S), wodurch ein Abbau des Hrd1<sup>S34L, F35L</sup> Proteins inhibiert werden sollte, sowie mit einem 6fachen HA-Epitop markiertes Hrd3. *HRD1* sowie *HRD1*<sup>S34L, F35L</sup> wurden Plasmid-basiert exprimiert. Die Fällung des Hrd3-6xHA erfolgte mit einem Epitop-spezifischem Antikörper. Zum Vergleich der ko-präzipitierten Mengen der Hrd1-Varianten wurden diese sowie Hrd3-6xHA und das Referenzprotein Sec61 mittels spezifischer Antikörper im Immunoblot detektiert.

### 2.3.2 Das E2-Enzym Ubc4 ist am Abbau von Hrd1 beteiligt

Bei den vorausgegangenen Untersuchungen von Hrd1<sup>S34L, F35L</sup> fiel auf, dass sich diese Hrd1-Variante durch Verwendung eines katalytisch inaktiven Ubc7 nur teilweise stabilisieren ließ (**Abbildung 2-25**). Dies deutet auf einen zweiten, von Ubc7-unabhängigen Abbauweg für Hrd1 hin. Da neben Ubc7 das mit der Doa10-Ligase assoziierte E2-Enzym Ubc6 eine wichtige Rolle im ERAD-Abbauweg spielt, sollte in einem Folgeexperiment der Einfluss von Ubc6, aber auch weiterer E2-Enzyme wie Ubc1 und Ubc4, auf den Abbau von Hrd1<sup>S34L, F35L</sup> untersucht werden. Dazu wurden verschiedene *hrd1*-Deletionsstämme verwendet die gleichzeitig eine Deletion unterschiedlicher E2-Enzyme aufwiesen. In diese wurde Plasmid-basiertes *HRD1*<sup>S34L, F35L</sup> transformiert und dessen Abbau im Cycloheximid-Experiment mit dem von Hrd1 verglichen (**Abbildung 2-26 A**). Der auch für Hrd1 zu beobachtende Abbau rührt daher, weil aus experimentellen Gründen Hrd1 und Hrd1<sup>S34L, F35L</sup> unter der Kontrolle eines CUP-Promotors standen. Dies führt zu einem initialen, der Überproduktion von Hrd1 verschuldetem Abbau (**Abbildung 2-22**), schränkt aber die Aussagekraft des Experiments in keiner Weise ein. Es zeigte sich, dass neben einem katalytisch inaktivem Ubc7 auch die Abwesenheit von Ubc4, aber nicht von Ubc6 oder Ubc1, zu einer deutlichen Stabilisierung von Hrd1<sup>S34L, F35L</sup> führte. Da die Abwesenheit von Ubc4 bei gleichzeitiger Verwendung von katalytisch inaktivem Ubc7 zu einem additiven Effekt für die Stabilität von Hrd1<sup>S34L, F35L</sup> führt, ist davon auszugehen, dass es sich um zwei parallele Abbauwege für Hrd1 handeln könnte.

Für Ubc7 ist bekannt, dass es eine Autoubiquitinierung von Hrd1 katalysieren kann (Baldrige and Rapoport, 2016; Vashistha *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu Ubc7 ist eine Beteiligung von Ubc4 im Zusammenhang mit der HRD-Ligase bisher noch nicht beschrieben. Abschließend sollte daher geklärt werden, ob es sich bei dem Ubc4-abhängigen Abbauweg von Hrd1 um einen von der Hrd1-RING-Domäne abhängigen Weg handelt. Dazu wurde erneut ein Cycloheximid-Abbauexperiment durchgeführt bei dem der *Linchpin*-Rest der Hrd1-RING Domäne mutiert wurde (Hrd1<sup>R400A</sup>). Der *Linchpin*-Rest führt dazu, dass das E2-Enzym korrekt für die Übertragung des Ubiquitins auf das Substrat positioniert wird. Für das humane Homolog zum Hefe Ubc4, dem UbcH5 wurde die Notwendigkeit des *Linchpin*-Restes für dessen Aktivität bereits beschrieben. Die Abhängigkeit des Ubc7 vom *Linchpin*-Rest wurde in der Arbeitsgruppe von Professor Sommer ebenfalls nachgewiesen (mdl. Mitteilung C. Lips). Wie der **Abbildung 2-26 B, C** zu entnehmen ist, führt allein die Substitution des *Linchpin*-Restes bei Hrd1<sup>S34L, F35L</sup> zu einer nahezu kompletten Stabilisierung dieses Proteins. Dies wird bestätigt durch Verwendung der Hrd1<sup>S34L, F35L, R400A</sup>-Variante im *ubc7*<sup>C89S</sup> bzw. im *ubc7*<sup>C89S</sup>  $\Delta$ *ubc4*-Stammhintergrund. Diese Ergebnisse zeigen, dass es keinen von der Hrd1-RING Domäne unabhängigen Abbauweg für Hrd1 gibt und bestätigen gleichzeitig die Vermutung, dass auch die Aktivierung des Hefe Ubc4 vom *Linchpin*-Rest der RING-Domäne abhängig ist.

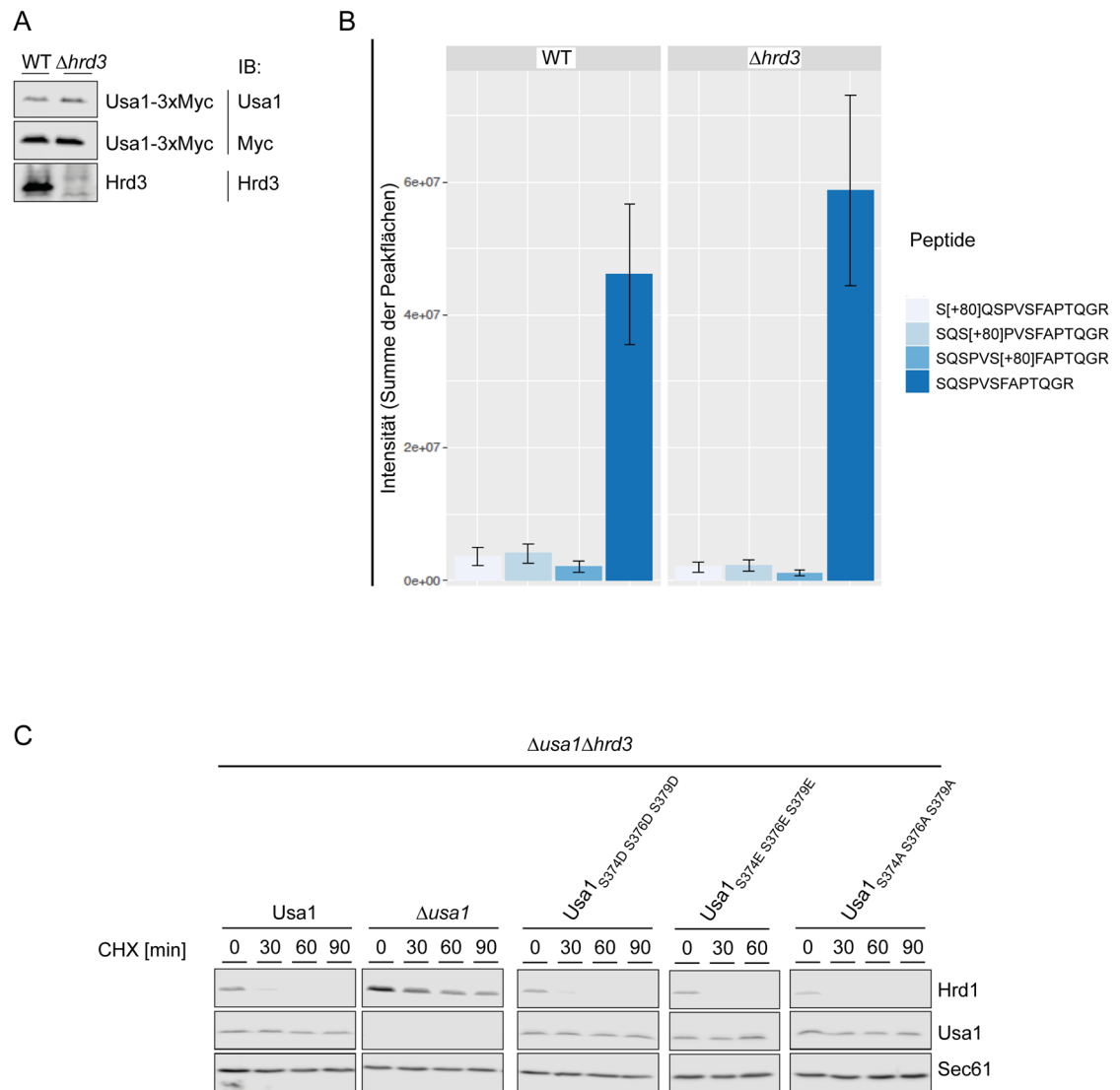


**Abbildung 2-26: Am Abbau von Hrd1 ist neben dem E2-Enzym Ubc7 auch Ubc4 beteiligt.** A) Cycloheximid-Experiment zur Untersuchung der beteiligten E2-Enzyme an der Degradation von Hrd1. Es wurden verschiedene *hrd1*-Deletionsstämme verwendet, die zusätzlich eine Deletion der Gene der gekennzeichneten E2-Enzyme aufwiesen. Im Fall von Ubc7 wurde anstatt der Deletion eine *ubc7*-Mutante exprimiert die zu katalytisch inaktivem Ubc7<sub>C89S</sub> führt. *HRD1*(-3xHA) und *HRD1*<sub>S34L, F35L</sub>-3xHA wurden plasmidbasiert unter einem CUP-Promotor exprimiert. Diese wurde für das vorliegende Experiment jedoch nicht zusätzlich induziert, sondern dessen basale Expression genutzt. Der Abbau von Hrd1<sub>S34L, F35L</sub> wurde über 90 min nach Cycloheximidzugabe verfolgt und die verbleibende Menge von Hrd1<sub>S34L, F35L</sub> im Immunoblot mittels spezifischem Antikörper im Vergleich zu Hrd1 analysiert. Als Protein zur Ladekontrolle diente Sec61. B) Für den Abbau von Hrd1 durch Ubc7 und Ubc4 wird der linchpin-Rest der Hrd1-RING Domäne benötigt. Cycloheximid-Experiment zur Analyse des Abbaus von Hrd1 in Abhängigkeit des linchpin-Restes und der E2-Enzyme Ubc7 und Ubc4. Experimentelles Vorgehen wie in A) beschrieben. C) Quantifizierung zweier unabhängig voneinander durchgeführter Cycloheximid-Experimente aus B). Es wurden die Intensitäten der Immunoblot-Signale mittels Fiji-Software ermittelt und mit Hilfe von Microsoft Excel die relativen Mittelwerte und deren Standardabweichungen für jeden Zeitpunkt ermittelt. Zur Darstellung der relativen Hrd1-Mengen wurde eine logarithmische Skala verwendet.

### 2.3.3 Einfluss von Usa1-Phosphorylierungen auf die Stabilität von Hrd1

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass der Verlust der Bindung zu Hrd3 über die luminaire Schleife von Hrd1 zum Abbau von Hrd1 führt. Wie in **Abbildung 2-24** schematisch dargestellt wurde ist bekannt, dass eine Eliminierung der UBL-Domäne von Usa1 einen Hrd3-bedingten Abbau von Hrd1 unterbinden kann. Damit könnte die UBL-Domäne unter Umständen eine Art Schalter darstellen, durch den der Abbau von Hrd1 in der Zelle beeinflusst werden kann. Vor allem die Erkenntnisse über UBL-Domänen anderer Proteine wie Rad23 (Liang *et al.*, 2014) oder Parkin (Aguirre *et al.*, 2017) führten zu der Idee, dass Phosphorylierungsereignisse innerhalb oder nahe an der UBL-Domäne eine transiente Assoziation der UBL-Domäne mit Hrd1 regulieren könnten. Für Usa1 sind in der *S. cerevisiae* Genom Datenbank (SGD; Cherry *et al.*, 2012) fünf nachgewiesene Phosphorylierungsstellen mit unbekannter Funktion eingetragen. Diese fünf Phosphorylierungsstellen befinden sich alle innerhalb der Hrd1-Bindedomäne und betreffen die Positionen S374, S376, S379, T383 und S387 von Usa1. Damit liegen diese Reste nicht innerhalb der UBL-Domäne selbst, befinden sich aber in einer dazu benachbarten Region (**Abbildung 2-28 A**). Mit Hilfe einer massenspektrometrischen Untersuchung sollte zunächst geklärt werden, ob sich die beschriebenen Phosphorylierungen in dem in diesem Labor verwendeten Hefestamm nachweisen lassen und ob es Unterschiede im Phosphorylierungsmuster bei Verwendung eines *hrd3*-Deletionsstammes gibt. Es wurde Epitop-markiertes Usa1 durch Immunopräzipitation mit einem Epitop-spezifischen Antikörper unter denaturierenden Bedingungen gefällt und eine massenspektrometrische Analyse des Präzipitats in Auftrag gegeben (D. Hernandez, MDC interne *Proteomics* Technologieplattform, **Abbildung 2-27 A und B**). Die Auswertung des Experiments ergab, dass sich ein sehr geringer Anteil an phosphoryliertem Usa1 für die drei Serine bei gezielter Analyse der entsprechenden Peptide nachweisen ließ. Für T383 konnte keine Phosphorylierung identifiziert werden und über S387 ließ sich aufgrund eines fehlenden Peptids keine Aussage machen. Auch konnte mit dieser Analyse nicht geklärt werden, ob es einen signifikanten Unterschied im Phosphorylierungsmuster von Usa1 in Abhängigkeit von Hrd3 gibt. Daher wurden im nächsten Schritt Usa1-Varianten erzeugt die entweder eine Phosphorylierung imitieren oder nicht mehr phosphoryliert werden können. Mit diesen Varianten wurde ein Cycloheximid-Abbauxperiment durchgeführt und die Stabilität von Hrd1 in Abwesenheit von Hrd3 analysiert (**Abbildung 2-27 C**). Die Auswertung dieses Abbauxperiments ergab, dass keine der verwendeten Usa1-Varianten den Hrd3-bedingten Abbau von Hrd1 inhibieren konnte. Die analysierten Phosphorylierungsstellen von Usa1 beeinflussen den Abbau von Hrd1 demnach nicht.





**Abbildung 2-27: Phosphorylierungen außerhalb der UBL-Domäne von Usa1 beeinflussen die Stabilität von Hrd1 nicht.** A) Zur Analyse der Hrd1-Regulation über mögliche Phosphorylierungen von Usa1 sollten die in der *Saccharomyces cerevisiae* Datenbank hinterlegten Positionen bekannter Phosphorylierungsstellen in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von Hrd3 massenspektrometrisch untersucht werden. Dazu wurde ein Hefestamm verwendet der genomisch *usa1(-3xMyc)* exprimiert sowie entweder *HRD3* oder  $\Delta hrd3$ . B) Die in A) beschriebenen Hefestämme wurden massenspektrometrisch auf das Vorhandensein von Phosphorylierungen an den Usa1-Positionen S374, S376, S379 und T383 untersucht (Dr. D. Perez Hernandez; MDC interne *Proteomics* Technologieplattform). C) Cycloheximid-Experiment zur Beurteilung des Einflusses von Usa1-Phosphomimicking-Varianten sowie phosphorylierungsresistenten Usa1-Varianten auf die Stabilität von Hrd1. In einen *usa1-hrd3*-Deletionsstamm wurde plasmidcodiertes *USA1* bzw. verschiedene *usa1*-Konstrukte transformiert. Die Stabilität von Hrd1 wurde über 90 min nach Zugabe von Cycloheximid verfolgt und die verbleibende Menge im Immunoblot mittels spezifischem Hrd1-Antikörper detektiert. Gleichzeitig wurde die Stabilität der Usa1-Varianten sowie das Referenzprotein Sec61 mittels spezifischer Antikörper im Immunoblot nachgewiesen.

#### 2.3.4 Der Abbau von Hrd1 kann durch ein Serin innerhalb der UBL-Domäne von Usa1 beeinflusst werden

Neben den in der *S. cerevisiae genome databank* (SGD, Cherry *et al.*, 2012) hinterlegten, nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen (Albuquerque *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2009) gibt es bisher nicht bestätigte, potentielle Erkennungsstellen für Kinasen innerhalb der Usa1-Sequenz (NetPhos3.1; Blom, Sicheritz-Pontén, Gupta, Gammeltoft, & Brunak, 2004). Darunter befinden sich auch die drei Serine S267, S293 und S298, die direkt in der UBL-Domäne von Usa1 gelegen sind (**Abbildung 2-28 A**). Um die räumliche Lage dieser drei Serine analysieren zu können, wurde eine Vorhersage der UBL-Struktur von Usa1 mit Hilfe des Programms Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) durchgeführt. Das errechnete Strukturmodell ist in **Abbildung 2-28B** dargestellt und die für eine Phosphorylierung potenziellen Serine sind rot hervorgehoben. Daneben sind die auf experimentellen Analysen beruhenden Strukturmodelle von Rad23 (Chen *et al.*, 2016) und Parkin (Aguirre *et al.*, 2017) gezeigt. Ebenfalls hervorgehoben sind die Serine, dessen Phosphorylierung einen Einfluss auf die Affinität jeweiliger Bindungspartner hat. Wie aus **Abbildung 2-28 B und C** ersichtlich wird, befinden sich alle drei potentiellen Phosphorylierungsstellen der Usa1-UBL Domäne auf der gleichen Seite einer gedachten Oberfläche. Eine Übereinstimmung der räumlichen Lage der Usa1-Serine und den Serinen der beiden anderen UBL-Domänen gibt es nicht. Auffällig ist jedoch, dass sich das S298 von Usa1 in einer größeren und dadurch vermutlich leicht zugänglichen und flexiblen Schleife befindet.

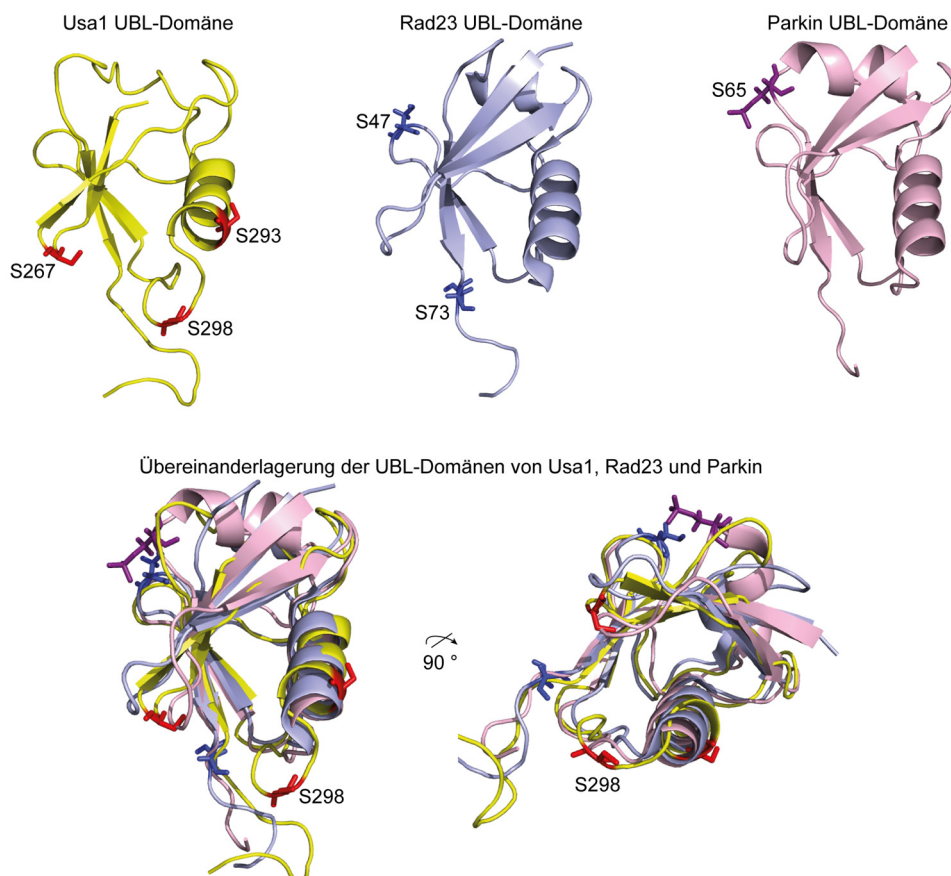
A

```

1  MSEYLAQTPCKFTIWSSEIDLIRTNLLVNAHPLSTVGRLLQYIHYQIYKQLRAIQPEEQCTNSEIPHTPLNSINTYFLS
81  YEGRELSATCLLKDITSSSHPDNSNHFIRLQLEKRTSPSGSAFDLEYDMEGEFNSMNIQFEINTLSSQRIFNSMEPNLPIG
161  TTLARLEKLALERIKDFEKSAGNLGKIKEDHSVSDLQGGFIKQKQTPMFLNYGSDSDYYKDLNLVDLIGIDFAPAHNSFF
241  TFLFKMNEQNSHIANDE267 UBL-Domäne 293 298
ERFVLEFISDATLSITQMNVPD267TVKQVKDFICSVYTHSLNLRNDIKLIYKGQLLHNNF
321  AGNSSKISEYIKEPHEVKVHVQIN374 376 379
QEYTESGPGFWNEVFNNPNIFQFMPPDTR374SQSPVS376FAP379TQGRSPAIRGEERGIPY
401  VTESGNDIVPTDELYRKCIINGDEVVFIPVSELNPQSSYLSVIKGDYGEIKIPISSNDYRINGDNILLSPSAIEQLESAL
Membranregion
481  NFKIERPRDSTLLHPSGEHVRAADNTSSANDNNTVENDESAWNRRVVRPLRNSFP481LLLVLRITFYLIGYNSLVPFFIILE
561  FGSFLPWKYIILLSLLFIRTVWNTQEVWNLWRDYLHLNEIDEVKFSQIKEFINSNLTNLFYKKCKDTQSAIDLLMIPN
641  LHEQRLSVYSKYDIEYDTNTPDVGQLNLLFIKVLSGEIPKDDELFEFFELYETTRNMNTLYPQDSLNEILLMIWKES
721  QKKDINTLPKYRRWFQTLCSQIAEHNVLDDVLRYYIIPDPVNDRVITAVIKNFVLFVWTLTPYVKEKLDIVAQRARDREQ
801  PAPSQQQENEDALIIPDEEPTATGAQPHLYIPDED

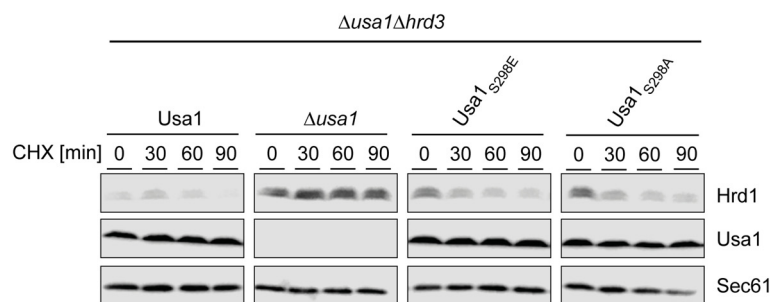
```

B



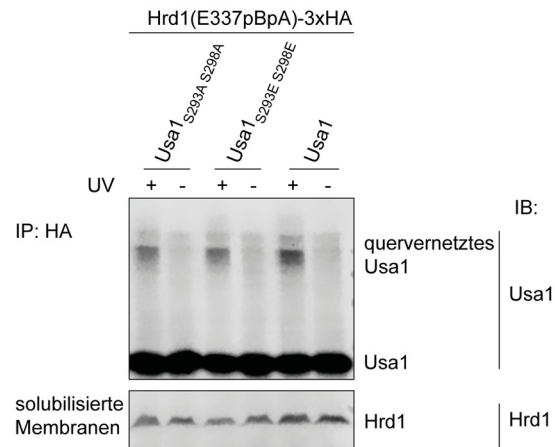
**Abbildung 2-28: Die UBL-Domäne von Usa1 weist drei potentielle Phosphorylierungsstellen auf.** A) Aminosäuresequenz von Usa1. Hervorgehoben sind: die UBL-Domäne (gelb), die Hrd1-Bindedomäne (grün), der Membrananker, sowie nachgewiesene (S374, S376, S379) und potentielle Phosphorylierungsstellen (S267, S293, S298) B) Cartoon-Darstellung der UBL-Domänen von Usa1 (gelb, Phyre2; Kelley *et al.*, 2015), Rad23 (lila, pdb 2NBU; Chen *et al.*, 2016) und Parkin (rosa, pdb 5TR5; Aguirre *et al.*, 2017). Hervorgehoben (*stick*-Darstellung) sind Phosphorylierungsstellen die die Bindungsaffinität der UBL-Domäne zu Partnerproteinen beeinflussen (Rad23 und Parkin) bzw. potenzielle Phosphorylierungsstellen, die in dieser Arbeit untersucht wurden (Usa1). Anhand der Sequenzüberlagerungen wird deutlich, dass sich die Lage der Serine der Usa1-UBL Domäne von der der Rad23 und Parkin Serine unterscheidet.

Um den Einfluss der Usa1-Serine auf die Stabilität von Hrd1 zu analysieren, wurden erneut Usa1-Varianten erzeugt in denen je eines der Serine durch ein Glutamat oder ein Alanin ersetzt wurde. Die Auswertung der Cycloheximid-Abbauxperimente ergab, dass sich eine Veränderung des S298 hemmend auf den Hrd3-bedingten Abbau von Hrd1 auswirkt. Dieser Effekt trat sowohl bei der phosphomimicking-Variante als auch bei dem, eine nichtphosphorylierte Variante imitierenden Usa1 auf (**Abbildung 2-29**). Ob der beobachtete Effekt daher auf einem Phosphorylierungsereignis beruht, ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht genau ermitteln.



**Abbildung 2-29: Eine Serin-Modifizierung innerhalb der UBL-Domäne von Usa1 beeinflusst die Stabilität von Hrd1.** Cycloheximid-Experiment zur Analyse der Hrd1-Stabilität in Abhängigkeit von S298 der UBL-Domäne von Usa1. In einen *usa1-hrd3*-Deletionsstamm wurde plasmidcodiertes USA1, *usa1*(S298E) oder *usa1*(S298A) transformiert. Die Stabilität von Hrd1 wurde über 90 min nach Zugabe von Cycloheximid verfolgt und die verbleibende Menge im Immunoblot mittels spezifischem Hrd1-Antikörper detektiert. Gleichzeitig wurde die Stabilität der Usa1-Varianten sowie das Referenzprotein Sec61 mittels spezifischer Antikörper im Immunoblot nachgewiesen.

Abschließend sollte überprüft werden, ob sich der Effekt der Serin-Substitution der UBL-Domäne von Usa1 auch auf das beobachtete Quervernetzungs-Produkt von Hrd1(E337pBPA) mit Usa1 auswirkt (**Abbildung 2-20**). Dazu wurde ein Crosslinking-Experiment mit einem *hrd1usa1*-Deletionsstamm durchgeführt in den drei Plasmide parallel transformiert wurden. Ein *hrd1*(E337pBPA)-, ein *usa1*<sub>S293 S298A</sub> oder *usa1*<sub>S293 S298E</sub> und das, die Aminoacyl-Synthetase kodierende Plasmid. Nach der UV-Bestrahlung, dem Zellaufschluss und der Immunopräzipitation unter denaturierenden Bedingungen wurde eine Quervernetzung zwischen Hrd1(E337pBPA) und den Usa1-Varianten im Immunoblot mit Hilfe eines Usa1-spezifischen Antikörpers analysiert. Es zeigte sich, dass sich die räumliche Nähe zwischen Hrd1(E337pBPA) und Usa1 durch die eingeführten Substitutionen innerhalb der UBL-Domäne nicht wesentlich veränderte (**Abbildung 2-30**). Zwar wurde eine etwas verminderte Intensität des Signals für das quervernetzte Produkt bei den Usa1-Varianten beobachtet, aber dies könnte auch experimentelle Gründe haben. Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass weitere Experimente über diese Arbeit hinaus nötig sind, um zu klären ob die UBL-Domäne von Usa1 an einer Regulation der Hrd1-Stabilität beteiligt ist.



**Abbildung 2-30: Die räumliche Nähe zwischen Hrd1 und Usa1 wird durch die Serin-Modifikation der UBL-Domäne nicht beeinflusst.** *In vivo Photocrosslinking* von Hrd1(E337pBPA-3xHA) zur Untersuchung der *Crosslinkingreaktion* mit Usa1-Varianten. Sowohl *hrd1(E337pBPA-3xHA)* als auch die Usa1-Konstrukte wurden plasmidbasiert in einen *hrd1-usa1*-Deletionsstamm transformiert. Der Vergleich der *gecrosslinkten* Hrd1-Usa1 Spezies erfolgte im Immunoblot mittels Usa1-spezifischer Antikörper.

## 3 Diskussion

In der Zelle haben Proteinqualitätskontrollmechanismen eine wichtige Funktion um die Proteinhomöostase aufrecht zu erhalten. Gerade für das endoplasmatische Retikulum spielen sie eine wichtige Rolle. Im Rahmen des Endoplasmatischen Retikulum-assoziierten Proteinabbaus (ERAD) werden fehlgefaltete Proteine erkannt und einem proteasomalen Abbau im Zytosol zugeführt. Über welchen Mechanismus die Dislokation dieser Proteine erfolgt und welche Faktoren daran beteiligt sind ist auch nach vielen Jahren Forschungsarbeit zu dieser Problematik noch nicht genau bekannt. Mittlerweile gibt es viele Hinweise dafür, dass die HRD-Ligase nicht nur die Erkennung und Ubiquitinierung der Substratproteine übernimmt sondern auch deren Dislokation. Neben der Ligasekomponente Der1 wird vor allem das zentrale E3 Enzym Hrd1 als mögliche Komponente des Dislokationsmechanismus diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Hrd1 Protein von *S. cerevisiae* durch genetische und biochemische Analysen weiterführend charakterisiert um zusätzliche Hinweise für eine Beteiligung von Hrd1 an der Dislokation luminaler ERAD-Substrate zu erhalten. Auf einige der Ergebnisse aufbauend wurden zudem erste Analysen zu einem möglichen Mechanismus durchgeführt, der die Stabilität von Hrd1 regulieren könnte.

### 3.1 Charakterisierung der Transmembranregion von Hrd1

Die Frage welche Funktion die Transmembrandomäne von Hrd1 für die Dislokation von luminalen ERAD Substraten ausübt lässt sich experimentell *in vivo* schwer beantworten. Denn neben einer möglichen Beteiligung an der Dislokation ist die Membranregion von Hrd1 für die Lokalisierung der Ubiquitinligase in der ER-Membran verantwortlich und bildet eine Plattform zur Assemblierung anderer Untereinheiten. Auf der zytosolischen Seite der ER-Membran befindet sich die RING-Domäne, die Dimerisierungsdomäne sowie die Bindungsdomäne für das Gerüstprotein Usa1 über welches Der1 zur Ligase rekrutiert wird. Hrd1 Varianten mit verkürzter Transmembranregion aber intakten zytosolischem Bereich sind funktionell defekt (Carvalho *et al.*, 2010). Ob die fehlenden Membranbereiche aber selbst an der Dislokation der Substrate beteiligt sind oder ob sie nur bestimmte Faktoren die eine Dislokation ermöglichen rekrutieren oder stabilisieren blieb ungeklärt.

#### 3.1.1 Veränderungen der dritten Membranhelix von Hrd1 beeinflussen den Abbau luminaler ERAD-Substrate

Die Analyse von konservierten hydrophilen Aminosäuren in der Membranregion von Hrd1 sollte einen Aufschluss darüber geben, ob Hrd1 direkt an der Dislokation von Substraten beteiligt ist. Im membranständigen Abschnitt von Hrd1 befinden sich nur wenige konservierte hydrophile Reste und diese sind vorrangig in den luminalen und zytosolischen Schleifen lokalisiert (**Abbildung 2-1**). Hierbei muss beachtet werden, dass die Lage der Helices in der Membran durch Algorithmen berechnet wurde und nur als Anhaltspunkt diente, da zu Beginn dieser Arbeit noch keine strukturellen Informationen über Hrd1 vorhanden waren.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Hrd1-Variante Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> identifiziert die zwei Aminosäuresubstitutionen im Bereich der dritten Helix aufweist. Der Austausch von E84 und H101 zu einem Leucin verhindert vorrangig den Abbau luminaler ERAD-Substrate (**Abbildung 2-4**). Die Degradation von Proteinen der ERAD-M Klasse erfolgt dagegen weitestgehend normal (**Abbildung 2-5**). Dies weist darauf hin, dass die Veränderungen bei Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> eine Funktion des Proteins betreffen, die spezifisch für den Abbau von luminalen ERAD-Substraten benötigt wird. Dabei konnte der beobachtete Effekt nur durch die Kombination dieser beiden Aminosäuresubstitutionen herausgestellt werden. Der Phänotyp der getesteten Einzelmутanten ließ hingegen kaum eine Beeinträchtigung des Substratabbaus erkennen (**Abbildung 2-3**). Basierend auf den verfügbaren Topologievorhersagen die im Falle der dritten Helix von Hrd1 auch mit dem kürzlich veröffentlichten Strukturmodell für Hrd1 übereinstimmen (Schoebel *et al.*, 2017), konnte die Lage der beiden Aminosäuresubstitutionen bestimmt werden. E84 und H101 befinden sich jeweils im Übergangsbereich der dritten Transmembran-Helix zum Zytosol bzw. zum ER-Lumen (**Abbildung 2-9**). Damit dürften die beiden Reste zur korrekten Lage und Verankerung der Helix in der ER-Membran beitragen. Der Austausch dieser polaren Aminosäuren durch unpolare Leucin-Reste verändert daher wahrscheinlich die Position der dritten Helix innerhalb des Hrd1 Proteins.

#### 3.1.1.1 Die Rekrutierung der Ligasekomponenten durch Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> ist unverändert

Um den Funktionsverlust von Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> weiter zu charakterisieren wurde untersucht, ob sich die Aminosäuresubstitutionen auf die Zusammensetzung der HRD-Ligase auswirken. Zumindest für den Minimalkomplex der Ligase, der neben Hrd1 auch Hrd3, Usa1 und Der1 beinhaltet, konnte durch Immunopräzipitationsexperimente kein Hinweis auf ein fehlerhaftes Rekrutieren einer dieser Komponenten gefunden werden (**Abbildung 2-7**). Da die Veränderungen bei Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> vorrangig eine Helix innerhalb der Membranregion betreffen, die Rekrutierung der genannten Komponenten aber hauptsächlich über Bindungsdomänen im Zytosol erfolgt, entsprachen die Ergebnisse den Erwartungen. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass andere Faktoren wie Cue1 oder Ubx2 die möglicherweise über Wechselwirkungen mit den Membranbereichen von Hrd1 rekrutiert werden in ihrer Assoziation mit der HRD-Ligase beeinflusst sind. Die Ergebnisse der Immunopräzipitationsexperimente ließen auch auf keine Veränderung der Hrd1-Dimer Bildung aufgrund der Aminosäuresubstitutionen schließen (**Abbildung 2-8**). Die Dimerisierung des Hrd1 Proteins ist für den Abbau luminaler ERAD-Substrate essentiell. Jedoch erfolgt auch die wechselseitige Bindung zweier Hrd1-Moleküle über einen Abschnitt innerhalb des zytosolischen N-Terminus, sodass von keiner Beeinträchtigung der Dimerisierung durch die E84- und H101-Substitutionen ausgegangen wurde. Ob aber die relative Ausrichtung sowohl der Ligasekomponenten als auch der Hrd1-Moleküle innerhalb der Membranregion bei Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> verändert ist, konnte anhand der Immunopräzipitationsexperimente nicht geklärt werden.

#### 3.1.2 Substitutionen von E84 und H101 von Hrd1 stören die korrekte sterische Ausrichtung der HRD-Ligase in der Membran

Um einen Hinweis auf eine veränderte räumliche Anordnung der HRD-Ligasekomponenten bei Vorhandensein der Hrd1 Variante zu erhalten, wurden chemische Quervernetzungs-Experimente durchgeführt. Der membrangängige, chemische *Crosslinker* DSS führt zu einer unspezifischen Quervernetzung zwischen

räumlich benachbarten Proteinen. In der Arbeit von Carvalho *et al.* (2010) wurde durch DSS-Quervernetzungsuntersuchungen die Bildung höhermolekularer Ligasekomplexe in Abhängigkeit von Usa1 nachgewiesen. Bei gleichzeitiger Produktion von Hrd1 und Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> in einer Zelle wurde eine verminderte Tendenz zur Ausbildung höhermolekularer Komplexe beobachtet (**Abbildung 2-12**). Die Größe dieser Quervernetzungsprodukte blieb aber unverändert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Koimmunopräzipitation deutet das auf die gleiche Zusammensetzung der HRD-Ligase hin. Die Ursache für eine verminderte Menge von oligomeren Komplexen in Anwesenheit von Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> kann nicht genau ermittelt werden. In der Annahme, dass Änderungen in der räumlichen Ausrichtung der Proteine zur Bildung verschiedener Quervernetzungsprodukte führen, wäre ein unterschiedliches Migrationsverhalten im Polyacrylamidgel zu erwarten gewesen. Dies konnte nicht beobachtet werden. Allerdings könnten die Abweichungen auch so gering sein, dass sie unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht nachgewiesen werden konnten. Auch wenn die Ursache für das beobachtete Ergebnis des Quervernetzungsexperimentes nicht genau ermittelt werden kann, zeigt dieses Experiment, dass eine Veränderung bei der Assemblierung einer höhermolekularen HRD-Ligase in der Zelle auftritt. Da vor allem für den Abbau luminaler ERAD-Substrate die Usa1-vermittelte Oligomerisierung entscheidend ist, könnten die beobachteten Abbaufekte bei Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> aus einer Veränderung der Komplexbildung resultieren.

Neben den unspezifischen Quervernetzungsexperimenten an der HRD-Ligase wurde auch ein spezifisches Quervernetzen von Hrd1 durch Einbau des photoaktivierbaren Crosslinkers pBPA anstelle einer bestimmten Aminosäure durchgeführt. Diese Methode bietet den Vorteil, dass genau bekannt ist an welcher Position eine Quervernetzung des Proteins stattgefunden hat. Im Rahmen dieser Experimente wurden Quervernetzungsprodukte des luminalen Abschnitts von Hrd1 zu Hrd3 sowie des C-terminalen zytosolischen Bereichs zu Usa1 beobachtet (**Abbildung 2-20**). Quervernetzungsprodukte der Membranregion zu anderen Komponenten der HRD-Ligase wurden nicht detektiert. Martin Mehnert (2012) hatte jedoch beobachtet, dass der Einbau von pBPA in membranständige Positionen von Der1 zu Quervernetzungen mit Hrd1 führt. Die Wiederholung dieser Experimente zeigte, dass sich das Muster der Quervernetzungsprodukte zwischen Der1 und Hrd1 ändert, wenn statt dem Wildtypprotein die Variante Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> vorhanden ist (**Abbildung 2-13**). Wahrscheinlich weist Hrd1<sup>E84L/H101L</sup> Umbildungen in der Membranregion auf die zu einer Veränderung in der räumlichen Anordnung der Proteine Der1 und Hrd1 führen. Allerdings kann nicht bewiesen werden, dass die untersuchten pBPA markierten Positionen von Der1 tatsächlich in der ER Membran lokalisiert sind, weil die Topologieinformationen zu Der1 hauptsächlich auf Hydropathie-Analysen beruhen und bisher keine Strukturdaten zu diesem Protein vorliegen. Nach dem Modell von Mehnert *et al.* (2014) passieren Substrate im Prozess der Dislokation zunächst Der1 bevor eine Übergabe an Hrd1 und die Ubiquitinierung im Zytosol erfolgt. Eine Veränderung in der räumlichen Ausrichtung von Hrd1<sup>E84L, H101L</sup> zu Der1 würde die Übergabe und damit auch den Abbau von luminalen Substraten behindern. Offensichtlich ist bei der Dislokation von ERAD-L Proteinen das Zusammenwirken von Hrd1 und Der1 entscheidend.

### 3.1.3 Hrd1 ist an der Translokation beteiligt

Mit den vorangegangenen Untersuchungen der Hrd1-Variante ließ sich eine Funktion der Transmembrandomäne von Hrd1 für den Abbau luminaler ERAD-Substrate zeigen. Ob es



sich bei dieser Funktion tatsächlich um die Ausbildung eines Dislokationskanals wie von Schoebel *et al.* (2017) postuliert handelt, sollten weitere Experimente zeigen. Anhand des Cryo-EM Modells von Hrd1 (Schoebel *et al.*, 2017) wurden Reste, die als funktionell bedeutend zu erkennen waren, verändert. Die in die vorhergesagte Pore gerichteten Seitenketten der Aminosäuren Q206, K119, E192 und D199 sollten entscheidend den Transport eines Substrates ermöglichen (**Abbildung 2-9**). Der Austausch dieser Aminosäuren zu Alanin hatte jedoch keinen ersichtlichen Einfluss auf den Abbau von CPY\* (**Abbildung 2-10**). Auch die anhand des Modells vorgenommenen Aminosäuresubstitutionen, um die Bedeutung der Reste E84 und H101 zu erschließen, bedingten keinen erkennbaren Funktionsverlust der Ligase (**Abbildung 2-10**). Letztendlich konnten somit keine experimentellen Hinweise für einen von Hrd1 gebildeten Translokationskanal erbracht werden. Kritisch anzumerken ist aber, dass die Überprüfung des Modells überwiegend nur durch einzelne Aminosäuresubstitutionen erfolgte. Es ist nicht auszuschließen, dass der Effekt einer einzelnen veränderten Aminosäure durch umliegende Reste kompensiert wird. Um die Gültigkeit des Modells eingehender zu überprüfen, sollte daher die Kombination von mehreren Aminosäuresubstitutionen analysiert werden.

Um dennoch eine direkte Beteiligung von Hrd1 an der Dislokation von Substraten zu analysieren, wurde die Methode des *in vivo photo Crosslinkings* genutzt (**Abbildung 2-14**). Damit wurde spezifisch nach Quervernetzungsprodukten zwischen Hrd1 und dem ERAD Substrat CPY\* gesucht. Trotz einer Vielzahl an Positionen in Hrd1 in die der Crosslinker integriert wurde (**Abbildung 2-15**) konnten keine Quervernetzungen zu CPY\* innerhalb der Membranregion gefunden werden. Demgegenüber wurden Quervernetzungen zwischen der ersten luminalen Schleife von Hrd1 und dem Substrat CPY\* detektiert (**Abbildung 2-20**). Dies steht im Einklang mit Beobachtungen, dass über diese luminal Schleife die Bindung des Substratrezeptors Hrd3 erfolgt (Carvalho *et al.*, 2010; Schoebel *et al.*, 2017). Auch in der Arbeit von Mehnert *et al.* (2014) wurden Quervernetzungen von Der1 zu Substratmolekülen vor allem an jenen Positionen detektiert, die eine räumliche Nähe zu Hrd3 aufwiesen. Die einen Abbaudedefekt für luminal ERAD-Substrate verursachende Hrd3-Variante Hrd3<sub>KR</sub> (Mehnert *et al.*, 2015) wies hingegen leichte räumliche Veränderungen in ihrer Orientierung zu Hrd1 auf (**Abbildung 2-21**). Auch in der räumlichen Nähe zwischen Hrd3<sub>KR</sub> und Der1 wurden solche Veränderungen festgestellt (Mehnert *et al.*, 2015). Für einen effizienten Abbau der ERAD-Substrate ist demnach die korrekte räumliche Ausrichtung des Substratrezeptors Hrd3 zu den Ligasekomponenten Der1 und Hrd1 von entscheidender Bedeutung. Nur so können Substrate nach ihrer Rekrutierung an die membranständigen Ligasekomponenten Der1 bzw. Hrd1 weitergegeben werden.

Neben den Quervernetzungsprodukten zwischen der luminalen Hrd1 Domäne und CPY\* konnten auch Quervernetzungen zwischen dem zytosolischen Hrd1-Rest F71 und CPY\* detektiert werden (**Abbildung 2-20**). Dabei könnte es sich um bereits im Zytosol befindliche Substratmoleküle handeln oder zumindest um Bereiche des Substrats die das Zytosol schon erreicht haben. Voraussetzung für diese Annahmen ist aber, dass die vorhandenen topologischen Informationen von Hrd1 stimmen. Innerhalb der Membranregion von Hrd1 konnten allenfalls schwache, schwer zu reproduzierende Quervernetzungen zum Substrat CPY\* beobachtet werden (**Abbildung 2-20**). Auch nach verschiedenen Versuchen, die Methode des pBPA-basierten *Crosslinkings* für die Membranbereiche von Hrd1 zu verbessern (**Tabelle 2-1**) oder die Verwendung

alternativer Substrate wie PRA\* oder einer modifizierten Variante von CPY\* konnten keine verlässlicheren Informationen erhalten werden. Aus verschiedenen Gründen kann es schwer sein Quervernetzungen zwischen der Hrd1 Membranregion und einem Substrat zu detektieren. Zunächst sollte mit diesem Versuchsansatz überhaupt analysiert werden, ob es eine räumliche Nähe zwischen diesen beiden Proteinen in der Zelle gibt. Es ist deshalb möglich, dass Substratmoleküle gar nicht in die Nähe der membranständigen Abschnitte von Hrd1 kommen. Auch der *Crosslinkers* pBPA könnte innerhalb der Membranbereiche durch externes UV-Licht schlechter aktivierbar sein als in zytosolischen oder luminalen Bereichen. Dass die Methodik generell auch für die membraneingebetteten Bereiche von Proteinen funktioniert, konnte bereits für die Ligasekomponente Der1 gezeigt werden (Mehnert *et al.*, 2014). Ausgeschlossen wurde zudem, dass die Integration des Crosslinkers pBPA in membranständige Bereiche von Hrd1 den Abbau des Proteins begünstigt. Basierend auf Cycloheximid-Abbauexperimenten für exemplarisch ausgewählte Hrd1-Varianten konnte keine verminderte Stabilität festgestellt werden (**Abbildung 2-18**). Generell ließen sich aber Unterschiede in der Menge der pBPA-haltigen Hrd1-Varianten nachweisen (**Abbildung 2-17**). Diese Variabilität trat aber unabhängig von der Position des eingebauten pBPAs auf und wurde auch schon bei der pBPA-Markierung von Der1 beobachtet (Mehnert, 2013). Ursächlich hierfür könnte der *nonsense-mediated mRNA decay* Kontrollmechanismus sein. Durch diesen Qualitätsmechanismus werden mRNA Moleküle auf das Vorhandensein von vorzeitigen Stopcodons hin überprüft und gegebenenfalls ein Abbau dieser Moleküle eingeleitet (Wang and Wang, 2008).

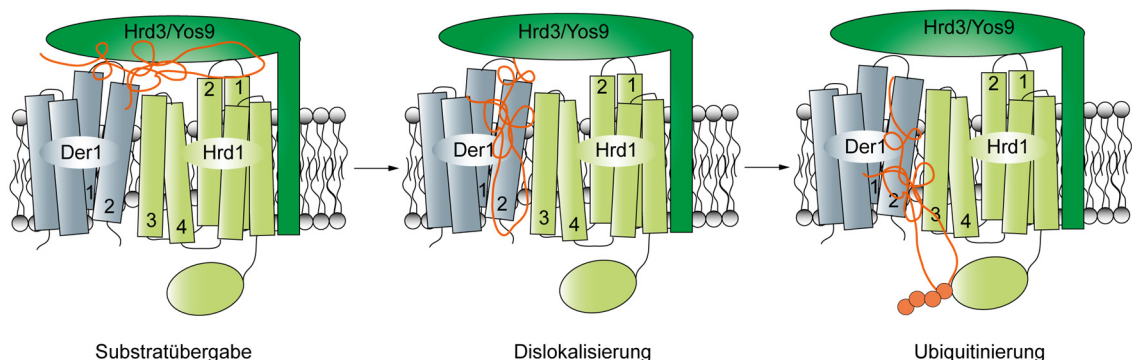
Die Schwierigkeit Substrate innerhalb der Membranregion mit Hrd1 querzuvernetzen könnte auch durch unterschiedliche Kinetiken der für den Substratabbau erforderlichen Prozesse hervorgerufen sein. Eine nur sehr geringe Aufenthaltsdauer innerhalb eines Dislokationsapparates zum Beispiel könnte die Häufigkeit für eine Quervernetzung zwischen Hrd1 und den Substraten während der Dislokation stark herabsetzen. Bisher gibt es aber noch keine Informationen zur Kinetik der einzelnen Schritte. Es wurde dennoch versucht, die Menge an Quervernetzungsprodukten eines Substrates mit Hrd1 zu erhöhen, indem der Abbauprozess an einem der Dislokation nachgeschalteten Schritt unterbunden wurde. Daher wurden die Experimente in einem *ubx2*-Deletionsstamm durchgeführt, in dem die Extraktion von Substraten aus der ER-Membran verzögert ist (Neuber *et al.*, 2005). Dadurch kommt es zu einer Anreicherung der Substrate im ER-Lumen und eventuell auch im Dislokationsapparat. Gegen eine solche Arretierung sprechen jedoch die Untersuchungen von Carvalho *et al.* (2010) in denen Quervernetzungen eines mit pBPA-markierten Substrats zu Hrd1 nachgewiesen wurden. Wurde die Ubiquitinierungsaktivität der HRD-Ligase in diesen Hefestämmen zerstört, etwa durch die Expression von katalytisch inaktivem Ubc7 oder Hrd1, waren diese Quervernetzungsprodukte nicht mehr detektierbar. Möglicherweise verhindert eine Störung der für den Substratabbau notwendigen zytosolischen Schritte auch die Dislokation der Substrate und diese werden vorwiegend im ER-Lumen angereichert.

Hin und wieder gelang es dennoch Quervernetzungen zwischen der dritten und vierten Helix von Hrd1 und dem Substrat CPY\* zu detektieren (**Abbildung 2-20**). Die schlechte Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse ließ aber keine Rückschlüsse zu, ob die beobachteten Quervernetzungsprodukte in funktionellem Zusammenhang mit dem Dislokationsprozess stehen. Dazu wären Experimente mit, im Substratabbau beeinträchtigten Varianten von Der1 oder Hrd1 wie beispielsweise mit der in dieser Arbeit

identifizierten Variante Hrd1<sub>E84L, H101L</sub> oder mit Der1<sub>RN</sub> (Mehnert *et al.*, 2014) hilfreich gewesen. Da eine solche Verifikation nicht erfolgen konnte, lassen sich nur Spekulationen anstellen. Auffällig ist, dass die beobachteten Quervernetzungen zu den Substraten die beiden Hrd1 Helices 3 und 4 betreffen. Diese liegen im Modell von Schoebel *et al.* (2017) in der Membran nebeneinander (**Abbildung 2-9**). Außerdem ist die Helix 3 diejenige, die von den Veränderungen in der Hrd1-Variante Hrd1<sub>E84L, H101L</sub> betroffen ist und die einen Abbaufekt für luminal Substrate verursacht.

#### 3.1.4 Ein Modell für die Rolle von Hrd1 bei der Dislokation von Substraten

In Hrd1<sub>E84L, H101L</sub>, das spezifisch den Abbau luminaler Substrate verzögert, ist wahrscheinlich die Position der dritten Helix des Transmembransegments leicht verändert. In den Quervernetzungsexperimenten wurde eine räumliche Nähe zwischen dem Substrat CPY\* und der dritten und vierten Helix von Hrd1 beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieser Bereich von Hrd1 am Abbau luminaler Substrate beteiligt ist. Möglicherweise könnten Helix 3 und 4 im Zusammenspiel mit Der1 die Dislokation luminaler Substrate ermöglichen. Entweder vermitteln sie die korrekte Positionierung von Der1 innerhalb der HRD-Ligase und beeinflussen so indirekt die Dislokation oder diese Helices sind selbst Bestandteil eines aus Hrd1 und Der1 gebildeten Dislokationsapparates.



**Abbildung 3-1: Modell für die Rolle von Hrd1 bei der Dislokation von ERAD-Substraten.** Fehlgfaltete luminal Proteine werden nach der Rekrutierung durch Hrd3/Yos9 an die membranständigen Komponenten der HRD-Ligase übergeben. Die Dislokation der Substrate wird nur bei korrekter räumlicher Ausrichtung der Transmembrandomänen von Der1 zu den Transmembrandomänen 3 und 4 von Hrd1 ermöglicht. Die involvierten Membranhelices stören die Integrität der Lipiddoppelschicht sodass ein Passieren für Substrate möglich wird. Dazu ist eine Dimerisierung der HRD-Ligase notwendig (nicht gezeigt). Die Barrierefunktion der Membran für Ionen bleibt dabei erhalten.

## 3.2 Hinweise für eine posttranslationale Regulation von Hrd1

Die Expression des *HRD1* Gen wird durch den Transkriptionsfaktor Hac1 reguliert (Kimata *et al.*, 2006). Durch Aktivierung der UPR aufgrund einer Anreicherung nicht-nativ gefalteter Proteine im ER wird die Menge von Hrd1 an den erhöhten Bedarf der ERAD-Kapazität angepasst. Ob es neben dieser transkriptionellen Regulation weitere Möglichkeiten gibt, die Proteinmenge von Hrd1 zu regulieren, ist nicht bekannt. Unlängst wurde ein Einfluss von Usa1 auf die Stabilität des Hrd1 Proteins festgestellt (Carroll and Hampton, 2010). Entscheidend für die Halbwertszeit des Proteins ist jedoch vor allem das Vorhandensein äquimolarer Mengen an Hrd3 (Gardner *et al.*, 2000). Kann keine Bindung von Hrd1 an Hrd3 erfolgen, wird Hrd1 nach Autoubiquitinierung über das 26S Proteasom abgebaut (Carroll and Hampton, 2010). Bisher beruhen diese Beobachtungen auf Experimenten in denen ein *hrd3*-Deletionsstamm verwendet wurde. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Binderegion von Hrd1 für Hrd3 nur wenige Reste der ersten luminalen Schleife von Hrd1 umfasst. Durch Substitution zweier benachbarter Aminosäuren in diesem Bereich wird eine Assoziation mit Hrd3 unterbunden und der Abbau von Hrd1 initiiert (**Abbildung 2-25**).

### 3.2.1 Ubc4 ist am Abbau von Hrd1 beteiligt

Es wurde zunächst untersucht, ob der Abbau der instabilen Hrd1-Variante Hrd1<sup>S34L, F35L</sup> von der eigenen Ubiquitinierungsaktivität sowie bestimmten E2 Enzymen abhängig ist. Dabei wurde besonders der Einfluss der ERAD E2-Enzyme Ubc7, Ubc6 und Ubc1 (Jungmann *et al.*, 1993; Sommer and Jentsch, 1993; Biederer *et al.*, 1996; Friedlander *et al.*, 2000) analysiert sowie der von Ubc4, das am Abbau fehlgefalteter Proteine in Stresssituationen beteiligt ist (Seufert and Jentsch, 1990, 1991, **Abbildung 2-26**). Wie erwartet konnte der Abbau durch Verwendung einer inaktiven Variante von Ubc7, dem mit der HRD-Ligase assoziierten E2-Enzyms, gehemmt werden (Gardner *et al.*, 2000). Für das mit der Doa10 Ligase assoziierte E2 Ubc6 sowie für Ubc1 wurde kein Einfluss festgestellt. Unerwartet war jedoch der Einfluss von Ubc4 auf die Degradation von Hrd1. Der Funktionsverlust von Ubc4 und Ubc7 führte zu einer kompletten Stabilisierung von Hrd1<sup>S34L, F35L</sup>. Bisher wurde eine Beteiligung von Ubc4 in Prozessen der HRD- und der Doa10-Ligase nicht beobachtet. Auch das homologe humane E2 Enzym UbcH5c ist bisher nicht im Zusammenhang mit der Proteinqualitätskontrolle des ER beschrieben. Daher wurde überprüft, ob es sich bei dem durch Ubc4 katalysierten Hrd1-Abbau um einen parallelen, von Hrd1 und vom ERAD-Prozess unabhängigen Weg handelt. Das dies nicht der Fall ist konnte durch Eliminierung des *Linchpin*-Restes von Hrd1, eines für die Aktivierung der E2 Enzyme wichtigen Restes einer RING-Domäne gezeigt werden (Pruneda *et al.*, 2012, **Abbildung 2-26**). Gleichzeitig wurde damit in dieser Arbeit bestätigt, dass auch die Aktivität des Hefe Enzyms Ubc4 wie die des homologen Säugetier E2s UbcH5c von der Anwesenheit eines *linchpin*-Restes in einer RING-Domäne abhängt (Pruneda *et al.*, 2012). Ob Ubc4 neben dem Abbau von Hrd1 auch eine Rolle für den Abbau bestimmter ERAD-Substrate spielt wurde in dieser Arbeit nicht näher analysiert. Anhand der hier gemachten Beobachtungen seiner Funktion beim Hrd1-Abbau ist diese Möglichkeit aber nicht ganz auszuschließen.

### 3.2.2 Der Abbau von Hrd1 wird durch eine UBL-Domäne beeinflusst

Die Abhängigkeit des Hrd1 Abbaus vom *Linchpin*-Rest zeigt die Notwendigkeit einer intakten Hrd1-RING Domäne für diesen Prozess und bestätigt die Annahme der Autoubiquitinierung (Vashistha *et al.*, 2016). Wie genau die Autoubiquitinierung von Hrd1 ausgelöst wird ist noch nicht bekannt. Interessant ist aber, dass das Fehlen des luminalen Bindungspartners Hrd3 die im Zytosol ablaufende Reaktion auslöst (Gardner *et al.*, 2000; Vashistha *et al.*, 2016). Naheliegender wären strukturelle Veränderungen bei Hrd1 die zur Autoubiquitinierung führen. Während die Experimente der Gruppe um Prof. Hampton nur eine Autoubiquitinierung von Hrd1 bei Fehlen des Bindungspartners Hrd3 zeigen (Vashistha *et al.*, 2016), vermutet die Gruppe um Prof. Rapoport jedoch eine aktive und für die Dislokation der Substrate notwendige Autoubiquitinierung unter normalen Bedingungen (Baldrige and Rapoport, 2016). Diese widersprüchlichen Beobachtungen könnten auf die unterschiedlichen Epitope bei der Proteinmarkierung zurückzuführen sein und bedürfen einer genaueren Analyse. Beide Arbeiten zeigen zwar die Funktionalität der Hrd1-Varianten beim Substratabbau bleiben einen genauen Vergleich der Stabilität der verwendeten Hrd1 Varianten zu unmarkiertem Hrd1 schuldig.

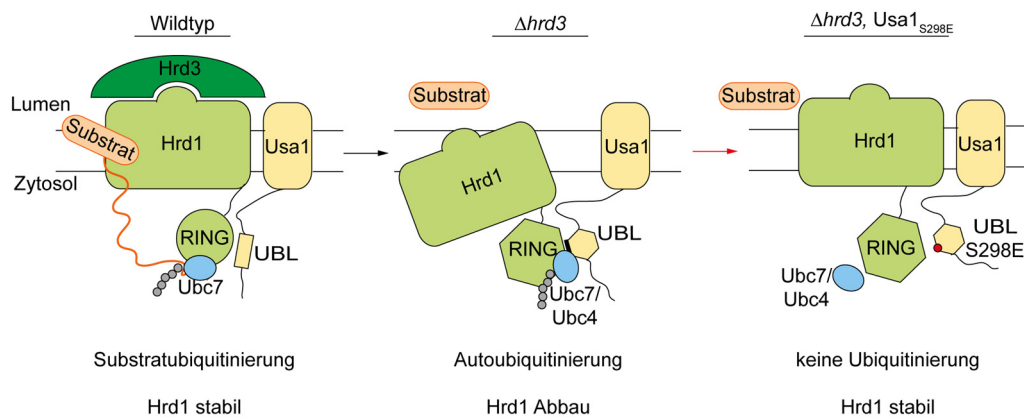
Im Zusammenhang mit der Autoubiquitinierung von Hrd1 konnte außerdem gezeigt werden, dass die UBL-Domäne von Usa1 diese Reaktion beeinflusst (Carroll and Hampton, 2010). Durch die Eliminierung der UBL-Domäne wird die Autoubiquitinierung von Hrd1 auch in Abwesenheit von Hrd3 unterbunden. So kann überexprimiertes, instabiles Hrd1 stabilisiert werden (Vashistha *et al.*, 2016). Neben dieser Beobachtung ist eine weitere Funktion der UBL-Domäne von Usa1 bisher nicht bekannt. Generell können UBL-Domänen als Bindungsdomänen für Partnerproteine fungieren. Durch Modifikationen der UBL-Domäne lässt sich zudem die Affinität zu den Bindungspartnern beeinflussen. Eine Veränderung der UBL Domäne von Parkin trägt nicht nur zur Aktivierung der E3-Ligasefunktion bei, sondern beeinflusst auch die Interaktion des Proteins mit einer proteasomalen Untereinheit (Sakata *et al.*, 2003; Ham *et al.*, 2016). Erst kürzlich wurde eine neue Funktion für eine UBL Domäne beschrieben, die durch sogenanntes „backside binding“ (Buetow *et al.*, 2015) Einfluss auf die Ubiquitinierungsreaktion eines E2-RING-Ligasekomplexes nimmt (Foster *et al.*, 2018). Dabei handelt es sich um die humane E3 Ubiquitinligase UHRF1 die an Methylierungsprozessen der DNA-Histone beteiligt ist. UHRF1 enthält eine UBL-Domäne die über einen hydrophoben Bereich an das beteiligte E2 UbcH5 bindet und sowohl die Autoubiquitinierung als auch die Substratubiquitinierung aktiviert. UbcH5 ist ein homologes E2 zum Hefe Ubc4 welches wie in dieser Arbeit gezeigt Einfluss auf die Autoubiquitinierung von Hrd1 hat. Für Ubc7 bzw. dessen humanem Homolog Ube2g2 wurde zwar keine Regulation durch eine UBL-Domäne gezeigt, wohl aber eine allosterische Aktivierung durch *backside binding* einer gp78 (humanes Hrd1 Homolog) internen Domäne (Chakrabarti *et al.*, 2017). Demnach könnte die UBL-Domäne von Usa1 eine transiente Wechselwirkung mit Hrd1 oder einem dazugehörigen E2 ausüben und so die RING-Aktivität von Hrd1 beeinflussen. Die eher unerwartete Detektion einer räumlichen Nähe zwischen Usa1 und der Umgebung der Hrd1-RING-Domäne im pBPA-basierten Crosslinking Experiment unterstützt die Idee einer möglichen Beeinflussung der Ubiquitinierungsreaktion von Hrd1 durch Usa1 (**Abbildung 2-20**).

Die Affinität einer UBL-Domäne zu ihrem Bindungspartner kann durch posttranslationelle Modifizierungen wie einer Phosphorylierung beeinflusst werden. Beispielsweise wird die katalytische Aktivität der E3-Ligase Parkin durch intramolekulare Bindung an eine UBL-Domäne inhibiert, bis diese phosphoryliert wird und dadurch dissoziiert (Ham *et al.*, 2016).

Auch die Affinität des *Shuttlefaktors* Rad53 zum Proteasom wird in Abhängigkeit seiner UBL-Domäne reguliert (Liang *et al.*, 2014). Im phosphorylierten Zustand wird die Bindung zum Ribosom geschwächt. Daher kam die Idee auf, ob eine Phosphorylierung der UBL-Domäne von Usa1 auf ähnliche Weise eine transiente Wechselwirkung mit Hrd1 ermöglicht und dadurch der Abbau von Hrd1 reguliert werden kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Substitution eines einzigen Serins der UBL-Domäne den Abbau von Hrd1 teilweise hemmen kann (**Abbildung 2-29**). Dieses S298 befindet sich innerhalb der potenziellen Erkennungssequenz für die cAMP-abhängige Protein Kinase A (PKA; NetPhos3.1 Blom, Sicheritz-Pontén, Gupta, Gammeltoft, & Brunak, 2004). PKA ist in einer Reihe von Stoffwechselwegen involviert und spielt eine wichtige Rolle für das Zellwachstum, den Metabolismus und die Stresstoleranz (Cannon *et al.*, 1990; Thevelein and de Winde, 1999; Tamaki, 2007). Eine tatsächliche Phosphorylierung der UBL-Domäne ist bisher nicht gezeigt. In den durchgeführten Abbauxperimenten führte sowohl eine die Phosphorylierung imitierende Substitution als auch eine Substitution die keine Phosphorylierung erlaubt zu einer Hemmung des Hrd1 Abbaus (**Abbildung 2-29**). Ob ein Phosphorylierungsereignis der UBL-Domäne daher diesen Prozess beeinflusst ist nicht abschließend geklärt. Es könnte allerdings auch sein, dass die Substitution des S298 von Usa1 zu einem Alanin ebenfalls zum Verlust der Bindungseigenschaften der UBL-Domäne führt, wodurch nicht mehr die volle Funktionalität erzielt werden kann. Um zu beurteilen ob sich die Substitution des S298 von Usa1 auf die räumliche Nähe zur Hrd1-RING Domäne auswirkt, wurde erneut ein pBPA-basiertes *Crosslinking* Experiment unter Verwendung der Usa1-Varianten Usa1<sub>S298E</sub> und Usa1<sub>S298A</sub> durchgeführt (**Abbildung 2-30**). Für beide Varianten wurde eine Quervernetzung zu Hrd1(E337pBPA) festgestellt und damit keine Veränderung der räumlichen Nähe zwischen Hrd1 und den Usa1-Varianten beobachtet. Bei der Durchführung des Experiments wurden allerdings keine Bedingungen gewählt die zu einem Abbau von Hrd1 führen würden. Vielleicht ist eine solche Situation aber nötig, damit sich Veränderungen der Bindungseigenschaften der Usa1UBL-Domäne überhaupt auswirken können. Letztendlich wäre der Nachweis einer Phosphorylierung der UBL-Domäne mittels gezielter massenspektrometrischer Analyse der naheliegende nächste Schritt für weitere Untersuchungen in dieser Richtung.

### 3.2.3 Ein Modell zum Einfluss der Usa1UBL-Domäne auf die Hrd1-Stabilität

Anhand der beschriebenen Ergebnisse ist es vorstellbar, dass über die UBL-Domäne von Usa1 der Abbau von Hrd1 reguliert werden kann. Damit gäbe es eine Möglichkeit die Menge von Hrd1 posttranslational in der Zelle anzupassen. Dies kann von Vorteil sein, um die ERAD-Kapazität nach Beendigung einer UPR Reaktion wieder auf ein normales Niveau zurückzubringen.



**Abbildung 3-2: Modell zur Beeinflussung der Hrd1-Autoubiquitinierung durch die UBL-Domäne von Usa1.** A) Bei einer vollständig assemblierten HRD-Ligase erfolgt im Rahmen des ERAD-Prozesses eine Substratubiquitinierung. Diese Reaktion wird durch An- oder Abwesenheit der UBL-Domäne von Usa1 nicht beeinflusst. Hrd1 ist stabil. B) Durch Fehlen des Bindungspartners Hrd3 kommt es zur Autoubiquitinierung von Hrd1 und in Folge dessen zum Abbau des Proteins. Für die Autoubiquitinierung ist die UBL-Domäne von Usa1 essentiell. Eine Veränderung der UBL-Domäne durch Substitution des S298 wirkt sich negativ auf die Reaktion aus. Vermutlich sind die Bindungseigenschaften der Domäne verändert.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Antikörper

**Tabelle 4-1** listet alle in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sowie deren Bezugsquelle auf. Viele der primären Antikörper wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Sommer (MDC, Berlin) selbstständig hergestellt. Alle verwendeten Antikörperlösungen wurden in TBT-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilch angesetzt. Lösungen mit primären Antikörpern wurden zusätzlich mit 0,05 % Natriumazid versetzt und bei 4 °C gelagert. Lösungen mit sekundären Antikörpern wurden stets frisch verwendet.

**Tabelle 4-1: Auflistung der verwendeten Antikörper.**

Bezeichnung	Verdünnung	Referenz/Quelle
Primäre Antikörper		
$\alpha$ -Hrd1, polyklonal, Kaninchen (270)	1:10.000	Horn <i>et al.</i> , 2009
$\alpha$ -Hrd3, polyklonal, Kaninchen (252)	1:1.000-5.000	Gauss <i>et al.</i> , 2006a
$\alpha$ -Der1, polyklonal, Kaninchen (266)	1:500	Horn <i>et al.</i> , 2009
$\alpha$ -Usa1, polyklonal, Kaninchen (272)	1:30.000	Horn <i>et al.</i> , 2009
$\alpha$ -Ubx2, polyklonal, Kaninchen (264)	1:2.000	Neuber <i>et al.</i> , 2005
$\alpha$ -Sec61, polyklonal, Kaninchen (214)	1:2.000	Biederer <i>et al.</i> , 1996
$\alpha$ -HA, monoklonal, Maus	1:1.000	Sigma (H9658)
$\alpha$ -HA, monoklonal, Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling (C29F4)
$\alpha$ -Myc, monoklonal, Maus	1:1.000	Sigma (M5546)
$\alpha$ -Myc, monoklonal, Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling (71D10)
$\alpha$ -CPY, monoklonal, Maus	1:1.000	Life Technologies (A6428)
$\alpha$ -Ubc7, polyklonal, Kaninchen (39)	1:1.000	Sommer Labor
Sekundäre Antikörper		
$\alpha$ -Maus IgG, HRP-konjugiert	1:10.000	Sigma (A9044)
$\alpha$ -Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	1:10.000	Sigma (A0545)
$\alpha$ -Maus IgG, IRDye® 680RD	1:5.000	Abcam (ab216776)
$\alpha$ -Kaninchen IgG, IRDye® 800CW	1:5.000	Abcam (ab216773)



### 4.1.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden entweder von Sigma, VWR oder Roth bezogen. Ausnahmen davon sind im Abschnitt 2.2 Methoden ausdrücklich vermerkt. Alle Pufferlösungen wurden mit deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt, welches durch Verwendung des Milli-DI Systems von Millipore erzeugt wurde.

### 4.1.3 Enzyme

<i>Pfu Ultra™ HF</i> DNA-Polymerase	Agilent
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNase A	Roth
T4 DNA-Ligase	Promega
<i>Phusion® HF</i> DNA-Polymerase	New England Biolabs
Zymolyase	MB Biomedicals

### 4.1.4 Größenstandards

<i>Color Prestained Protein Standard, Broad Range (#P7712)</i>	New England Biolabs
λ-DNA (HindIII)	Serva
<i>1 kb DNA Ladder</i>	Invitrogen

### 4.1.5 Geräte und sonstige Materialien

<i>Amersham Hybond LFP 0,2 PVDF Membrane</i>	GE Healthcare
Brutschrank B500	Memmert
Durchlichtmikroskop Standard 25	Zeiss
Drehrad Stuart® SB3	Cole-Parmer
<i>Electrophoresis Mighty Small II</i>	Hoefer
<i>Gel dryer Model 583</i>	BioRad
<i>Gene Pulser</i>	BioRad
IKA Vibrax VXR basic	IKA
Inkubationsschüttler Innova 44	New Brunswick Scientific
Magnetrührer IKamag RCT	IKA
Mikromanipulator	Singer Instruments
<i>Mini Horizontal Agarose Electrophoresis Unit HE33</i>	Hoefer
NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Odyssey® Fc Imaging System	LI-COR Biosciences
PCR-Zykler Primus 25	peQLab

pH-Meter	Schott
Phosphorimager Typhoon FLA9500	GE Healthcare
<i>PVDF Transfer Membrane (#88518)</i>	Thermo Fisher Scientific
Spectrophotometer Ultraspec 3100 pro	Amersham Bioscience
UV-Lampe (B-100AP)	UVP
UV-Transilluminator Gel-Doc	peQLab
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad Fisons DC1 W13	HAAKE
<i>Whatman Blotting-Papier</i>	Roth
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge 5430R	Eppendorf
Zentrifuge 4K15	Sigma

#### 4.1.6 Hefestämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme sind in der **Tabelle 1** im Anhang A aufgelistet. Dabei handelt es sich um Derivate des haploiden Hefestamms YWO1 (Seufert *et al.*, 1990). Die angegebenen Genotypen in der Tabelle beziehen sich daher auf Veränderungen gegenüber dem YWO1-Stamm (*lys2-801*, *leu2-3*, *2-112*, *ura3-52*, *his3Δ200*, *trp1Δ1*). *prc1-1* bezeichnet den Genlocus des ERAD-Substrates CPY\*.

#### 4.1.7 Kommerzielle Reaktions- und Nachweissysteme

<i>Expand High Fidelity PCR System</i>	Roche Applied Science
<i>pGEM®-T Easy Vector System</i>	Promega
<i>QuickChange® Site Directed Mutagenesis Kit</i>	Agilent Technologies
<i>Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus</i>	PerkinElmer
<i>SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kit</i>	Invitrogen
<i>Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System</i>	Promega

#### 4.1.8 Medien

Die nachfolgend aufgelisteten Medien wurden für die Kultivierung von *E. coli* Bakterien verwendet.

LB-Medium	1 % (w/v) Bacto™ Trypton; 0,5 % (w/v) Bacto™ Yeast Extract; 1 % (w/v) NaCl; pH 7,5
LB-Amp-Medium	LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin
LB-Kan-Medium	LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin

X-Gal + IPTG-Kulturplatten	LB-Medium mit Ampicillin, 2 % (w/v) Agar, 1 mM IPTG; 400 µM X-Gal
SOC-Medium	2 % (w/v) Bacto™ Trypton; 0,5 % (w/v) Bacto™ <i>Yeast Extract</i> ; 0,4 % (w/v) D-Glucose, 10 mM NaCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 2,5 mM KCl; pH 7,4

Im Folgenden sind die Medien zur Kultivierung von Hefen dargestellt.

YPD-Vollmedium	2 % (w/v) Bacto™ Pepton; 1 % (w/v) Bacto™ <i>Yeast Extract</i> ; 2 % D-Glukose; pH 5,5
SD-Minimalmedium	0,67 % (w/v) <i>Yeast Nitrogen Base</i> ohne Aminosäuren; 2 % (w/v) D-Glukose; 20 mg/l L-Histidin; 30 mg/l L-Leucin; 30 mg/l L-Lysin; 20 mg/l L-Tryptophan; 20 mg/l Adeninsulfat; 20 mg/l Uracil  (für SD-Selektions-medium wurde die entsprechende Aminosäure weggelassen)
YPD-Platten	2 % (w/v) Agar-Agar, restliche Bestandteile siehe YPD-Medium
SD-Platten	2 % (w/v) Agar-Agar, restliche Bestandteile siehe SD-Minimalmedium
5-FOA-Platten	2 % (w/v) Agar-Agar, 0,67 % (w/v) <i>Yeast Nitrogen Base</i> ohne Aminosäuren; 2 % (w/v) D-Glukose; 20 mg/l L-Histidin; 30 mg/l L-Leucin; 30 mg/l L-Lysin; 20 mg/l L-Tryptophan; 20 mg/l Adeninsulfat; 70 mg/l Uracil, 1 mg/ml 5' FOA
YPD-G418	YPD-Vollmedium; 200 mg/l G418
PräSpo-Medium	0,8 % (w/v) Bacto™ <i>Yeast Extract</i> ; 0,3 % (w/v) Bacto™ Pepton; 10 % (w/v) Glukose
Spo-Medium	0,1 % (w/v) Bacto™ <i>Yeast Extract</i> ; 0,05 % (w/v) Gukose; 1 % (w/v) KOAc
SED-Medium	18,2 % (w/v) Sorbit; 25 mM EDTA

#### 4.1.9 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind der **Tabelle 2** im Anhang A zu entnehmen.

#### 4.1.10 Puffer und verschiedene Lösungen

5x DNA-Probenpuffer	50 % (v/v) Glycerin; 5 mM EDTA; 1,25 % (w/v) OrangeG
Minipräp-Lösung A	50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 0,1 mg/ml RNaseA; pH 8,0
Minipräp-Lösung B	200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS

Minipräp-Lösung C	3,2 M KOAc (pH 5,5); 11,5 % (v/v) Essigsäure
Hefe-Trafo-Lösung A	100 mM LiOAc; 1x TE (pH 8)
Hefe-Trafo-Lösung B	100 mM LiOAc; 1x TE (pH 8); 40 % (w/v) PEG 3500
10x TBT-Puffer	500 mM Tris/HCl; 1,5 M NaCl; 1 % (v/v) Tween 20; pH 7,5
50x TAE-Puffer	2 M Tris/HCl; 7 % (v/v) Essigsäure; 50 mM EDTA; pH 8,2
DNA-Präp-Puffer	2 % Triton (v/v); 1 % SDS (v/v); 100 mM NaOH; 10 mM Tris (pH 8); 1 mM EDTA
Coomassie-Färbelösung	45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250
IP 15-Puffer (1,2x)	60 mM Tris (pH 7,5); 480 mM KoAc, 1,2 mM, EDTA, 12 % Glycerin, 1 mM PMSF
IP 15-Puffer (1x)	50 mM Tris (pH 7,5); 400 mM KoAc, 1 mM, EDTA, 10 % Glycerin, 1 mM PMSF
IP 0,1-Puffer	50 mM Tris (pH 7,5); 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton; 0,1 % (v/v) SDS
Lyse-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 % (w/v) SDS
Puffer-M	50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 1mM PMSF; pH 5
NaOH-Auflösungspuffer	0,1 M NaOH, 2 % (w/v) SDS, 5 mM EDTA, 10 mM DTT
DSS-Solubilisierungspuffer	50 mM HEPES (pH 7,9); 200 mM NaCl; 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 % (v/v) NP40, 1 mM PMSF
DSS-Puffer	50 mM HEPES (pH 7,9); 200 mM NaCl; 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM PMSF
Puffer-A	50 mM HEPES (pH 7,4); 300 mM KCl; 1 mM PMSF
SDS-PAGE-Sammelgel	3 % (v/v) Acrylamid; 0,15 % (v/v) Bisacrylamid; 125 mM Tris/HCl (pH 6,8); 0,1 (v/v) % SDS; 0,25 % (v/v) TEMED; 2,5 % (v/v) APS
SDS-PAGE-Trenngel (12 %)	12 % (v/v) Acrylamid, 0,09 % (v/v) Bisacrylamid; 500 mM Tris/HCl (pH 8,8); 0,1 % (v/v) SDS; 0,02 % (v/v) TEMED; 0,1 % (v/v) APS
SDS-PAGE-Trenngel (9 %)	7,5 % (v/v) Acrylamid, 0,05 % (v/v) Bisacrylamid; 500 mM Tris/HCl (pH 8,8); 0,1 % (v/v) SDS; 0,02 % (v/v) TEMED; 0,1 % (v/v) APS
2x SDS-Probenpuffer	135 mM Tris/HCl (pH 6,8); 20 % (v/v) Glycerol; 4 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 100 mM DTT
3x SDS-Probenpuffer	203 mM Tris/HCl (pH 6,8); 30 % (v/v) Glycerol; 6 % (w/v) SDS; 0,15 % (w/v) Bromphenolblau; 300 mM DTT
Harnstoff-Probenpuffer	8 M Harnstoff; 200 mM Tris/HCl pH 6,8; 5 % (w/v) SDS; 0,1 mM EDTA; 0,03 % (w/v) Bromphenolblau; 1,5 % (w/v) DTT

5x SDS-PAGE-Laufpuffer	1,5 % (w/v) Tris-Base; 7,2 % (w/v) Glycerin; 0,5 % (w/v) SDS
Western-Blot-Transferpuffer	15 % (v/v) Isopropanol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin
Amidoschwarz-Färbelösung	0,1 % (w/v) Amidoschwarz, 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärbelösung	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie R250
Coomassie-Entfärbelösung	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
CPY-Farbtest-Puffer	20 % (v/v) N-Benzoyl-L-Tyrosin-p-Nitroanilid mit 2,5 mg/ml gelöst in Dimethylformamid; 80 % Tris-HCl mit 0,1 M, pH 7,5

#### 4.1.11 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind der **Tabelle 3** im Anhang A zu entnehmen. Die Synthese der Oligonukleotide wurde von der Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH übernommen. Oligonukleotide für gewöhnliche PCR-Ansätze umfassten eine Länge von 20 bis 25 Basenpaare. Oligonukleotide zur Verwendung mit dem *QuickChange® Site Directed Mutagenesis Kit* sowie für genetische Veränderungen bei Hefen durch homologe Rekombination waren 40 bis 50 Basenpaare lang und wurden bei der Firma BioTeZ als HPLC- gereinigte Produkte bestellt.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe in einem Agarosegel. Zur Herstellung dieses Agarosegels wurden 0,8 – 1 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und auf 50 °C abgekühlt. Zur Detektion der DNA wurde der interkalierende Farbstoff RedSafe mit der Agaroselösung vermengt. Die DNA-Proben wurden zur Auftragung mit DNA-Probenpuffer versetzt und die Agarose-Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 110 V für 15-30 min in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Die Detektion der DNA erfolgte mit einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 309 nm.

#### 4.2.1.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde das *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* verwendet. Zunächst wurde die gewünschte DNA mit

Hilfe eines Skalpells unter einer niederenergetischen UV-Lampe herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Vorgehensweise erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Abschließend wurde die DNA in 20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration der Lösung mit Hilfe des NanoDrop ermittelt.

#### 4.2.1.3 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch die Firma LGC Genomics GmbH Berlin. Die DNA-Proben wurden entsprechend der Vorgaben konzentriert und falls erforderlich zuvor mithilfe des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems* aufgereinigt.

#### 4.2.1.4 Präparation von genomischer DNA aus Hefen

Für die Isolierung genomischer DNA aus Hefe wurden 3,5 ml einer über Nacht in YPD-Medium gewachsenen Hefekultur durch Zentrifugation bei 6000 g für 1 min geerntet. Das Zellpellet wurde mit 500 µl ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend aufgeschlossen. Dazu wurde es mit 200 µl DNA-Präp-Puffer, 200 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholgemisches und Glaskugeln versetzt. Zur mechanischen Lyse wurde das Gemisch heftig im Vortex für 2-3 min geschüttelt. Danach wurde das Lysat mit 200 µl 1x TE-Puffer (pH 8) versetzt und zur Phasentrennung für 5 min bei Raumtemperatur mit 20.000 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, mit 1 ml Ethanol (97 % v/v) vermischt und gut invertiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 10.000 g wurde das Pellet in zwei Schritten in je 100 µl und 300 µl 1x TE (pH 8) resuspendiert. Anschließend erfolgte ein Verdau der RNA mit 3 µl RNase A (10 mg/ ml) und 10 µl Ammoniumacetat (4 M) für 5 min bei 37 °C. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 ml Ethanol (97 % (v/v)) und einer Zentrifugation für 5 min bei 10.000 g gefällt. Nach dem Trocknen des Pellets bei 30 °C für 10 min wurde die DNA in 50 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 4.2.1.5 Polymerasekettenreaktionen (PCR)

Die PCR wurde zur spezifischen Amplifizierung von DNA-Molekülen eingesetzt. Die Zusammensetzung der verwendeten PCR-Ansätze sowie die zugehörigen PCR-Programme sind im Anhang XY aufgeführt.

#### 4.2.1.6 Gerichtete Punktmutagenese von Plasmid-DNA

Für das gezielte Einfügen von Punktmutationen in Plasmid-DNA wurde das QuickChange® Site Directed Mutagenesis Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Das genaue PCR-Programm zur Generierung der Plasmid basierten *hrd1*-Mutanten ist im Anhang dargestellt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde zur Degradation der Ausgangs-DNA für 1 h bei 37 °C mit dem Enzym Dpn1 verdaut. Anschließend erfolgte zur Vermehrung der Plasmid-DNA eine Transformation des PCR-Produkts in *E. coli* Zellen.

#### 4.2.1.7 Restriktionsverdau von DNA

Für den Verdau von DNA-Molekülen mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme wurden den Herstellerangaben entsprechende Bedingungen gewählt. Für analytische Zwecke wurde ein 20 µl Reaktionsansatz verwendet für den ca. 1 µg DNA eingesetzt wurde, während für präparative Ansätze ca. 5 µg DNA verdaut wurden. Die Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme waren entweder bereits in der Ausgangs-DNA vorhanden oder wurden in diese zuvor gezielt durch Verwendung entsprechender Oligonukleotide in einer PCR-Reaktion eingefügt. Die anschließende Analyse und Reinigung der DNA-Fragmente

erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese und dem *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*.

#### 4.2.1.8 DNA-Transformation in *E. coli*

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen wurden elektrokompetente XL1blue Zellen (Agilent Technologies) verwendet. Dazu wurde ein bei -80 °C aufbewahrtes 50 µl Aliquot dieser Zellen auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurde ca. 1 ng DNA mit den elektrokompetenten Zellen vermischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Handelte es sich bei der verwendeten DNA um einen Ligationsansatz wurden 10 µl eines zuvor dialysierten Ligationsansatzes transformiert. Zur Aufnahme der DNA durch die *E. coli* Zellen wurde ein Elektropuls mit 2,5 MV und 25 µF durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen zur Regeneration mit 400 µl vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Es wurden 20-50 µl der Bakteriensuspension auf eine LB-Agar Platte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Zur Durchführung einer Blau/Weiß-Selektion bei Verwendung des pGEM®-T Easy Vektors wurden 50 µl der Bakteriensuspension auf eine LB-Ampicillin Platte mit IPTG und XGal ausplattiert.

#### 4.2.1.9 DNA-Transformation in Hefe

Zur Transformation von DNA in Hefezellen wurden diese in 20 ml YPD-Medium bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,8 -1 kultiviert. Es wurde 1 ml dieser Kultur in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugieren bei 3500 rpm für 1 min geerntet. Das Zellpellet wurde zunächst mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O und anschließend mit 1 ml Hefe-Trafo-Lösung A gewaschen und jeweils für 1 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 100 µl Hefe-Trafo-Lösung A aufgenommen und mit 1-3 µg der gewünschten DNA versetzt. Zur Steigerung der Transformationseffizienz wurden zusätzliche 2,5-5 µl denaturierte Heringssperma-DNA zum Ansatz gegeben. Anschließend wurde diese Zellsuspension mit 500 µl Hefe-Trafo-Lösung B gut durchmischt und für 30 min bei 30 °C im Thermoschüttler bei 700 rpm inkubiert. Die Zellen wurden dann einem Hitzeschock von 15 min bei 42 °C ausgesetzt. Zur Abtrennung der Transformationslösungen wurde der Ansatz für 2 min bei 4000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 80-100 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Abschließend wurden 30-50 µl Zellsuspension auf SD-Selektionsplatten ausplattiert und für 3 Tage bei 30 °C im Heizschrank inkubiert.

#### 4.2.1.10 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen wurden 2,5 ml LB-Medium mit Ampicillin oder Kanamycin mit einer Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden 2 ml dieser Kultur in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugieren für 30 sec bei 13.000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend sorgfältig in 150 µl Lösung 1 gelöst. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 150 µl der Lösung 2 und fünfmaligem Invertieren des Ansatzes. Zur Fällung der Proteine wurden 150 µl der Lösung 3 zur Suspension gegeben und 2-3 mal gut invertiert. Zur Gewinnung der wässrigen DNA-haltigen Phase erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml Ethanol gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm und ein Absaugen des Ethanols. Zur Evaporation des verbleibenden Ethanols wurde die pelletierte DNA für 10 min bei

50 °C inkubiert. Abschließend wurde die isolierte DNA in 50 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration der Lösung photometrisch mit dem Nanodrop ermittelt.

#### 4.2.1.11 Modifikationen der genomischen DNA von Hefezellen

Für eine Gendeletion oder eine N- oder C-terminale Epitopmarkierung wurden gängige, auf homologer Rekombination basierende Methoden verwendet (Longtine *et al.*, 1998; Knop *et al.*, 1999; Janke *et al.*, 2004). Zunächst wurde mit Hilfe einer PCR eine gewünschte DNA-Kassette amplifiziert, die am 5' und am 3'-Ende zur Zielregion homologe Sequenzen aufwies. Für eine Gendeletion enthielt die DNA-Kassette nur ein Selektionsmarkergen, während zur Epitopmarkierung neben diesem Gen auch die Sequenz des gewünschten Epitops vorhanden war. Von einem 50 µl PCR-Ansatz wurden 30 µl nach dem Protokoll von Abschnitt 4.2.1.9 in die Hefezellen transformiert. Je nach gewähltem Selektionsmarker wurden die Hefen entweder auf SD-Selektionsplatten oder YPD-Antibiotika-Platte ausplattiert. Bei Verwendung von Antibiotika enthaltenden Platten wurden die Hefen nach der Transformation zunächst für 2 h bei 30 °C inkubiert um die Expression des Resistenzgens zu ermöglichen. Abschließend wurden Einzelkolonien per PCR oder per Immunoblot auf das Vorhandensein der gewünschten genetischen Veränderung untersucht.

Für eine genomische Integration von Punktmutanten wurden Integrationsplasmide der pRS-Serie verwendet (Sikorski and Hieter, 1989; Christianson *et al.*, 1992). Auch hierbei erfolgt die Integration der gewünschten DNA aufgrund homologer Rekombination. Zunächst wurde das gewünschte Gen mittels gängiger Klonierungsstrategien unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen in das Integrationsplasmid integriert. Das Einfügen von Punktmutationen erfolgte durch Verwendung des *QuickChange® Site Directed Mutagenesis Kit*. Anschließend wurde das Integrationsplasmid mit Hilfe einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert und durch Transformation in die Hefen transferiert. Geeignete Einzelkolonien wurden anhand des transformierten Selektionsmarkers identifiziert und per PCR oder Immunoblot auf die gewünschte Genintegration hin analysiert.

#### 4.2.1.12 Kolonie-PCR für Hefe

Eine Kolonie-PCR wurde durchgeführt um eine genetische Veränderung eines Hefestammes anhand eines PCR-Produktes zu überprüfen. Die Methode konnte für PCR-Produkte bis zu einer Größe von 1500 bp verwendet werden. Zur Durchführung der Kolonie-PCR wurde mit einem sterilen Zahnstocher etwas Zellmaterial einer Hefeplatte in 10 µl NaOH-Lösung (20 mM) in einem PCR-Reaktionsgefäß suspendiert. Die Zellen wurden durch Erhitzen für 10 min bei 95 °C aufgeschlossen und 2 µl dieser Lösung in einem 50 µl Ansatz für eine PCR eingesetzt. Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm sind dem



Anhang B      PCR-Programme und Ansätze zu entnehmen.

## 4.2.2 Biochemische Methoden

### 4.2.2.1 Gesamtzellaufschluss von Hefezellen

Der Gesamtzellaufschluss von Hefezellen wurde überwiegend zum qualitativen Nachweis von Proteinen eingesetzt und basierte auf chemischer Lyse. Es wurden 15 ml einer in der stationären Wachstumsphase befindlichen Hefekultur eingesetzt. Die Ernte erfolgte durch eine 2 minütige Zentrifugation bei 3000 g und 4 °C. Das resultierende Zellpellet wurde in 200 µl DTT-haltigem NaOH-Aufschlusspuffer sorgfältig resuspendiert und für 10 min bei 65 °C und 400 rpm im Thermoblock inkubiert. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm. Abschließend wurden 50 µl des Überstands mit 50 µl 2x-Probenpuffer durchmischt und zur weiteren Analyse bei -20 °C aufbewahrt oder mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunoblot analysiert.

### 4.2.2.2 Isolierung der Membranfraktion aus Hefezellen

Zur Analyse von membranständigen Proteinen oder Proteinen aus dem ER wurde eine Mikrosomenpräparation nach mechanischer Lyse der Hefezellen durchgeführt. Zunächst wurden zweimal 2 ml Hefekultur in einem 2,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt und die Hefen durch Zentrifugieren für 2 min bei 4°C und 3000 g pelletiert. Für den Zellaufschluss wurden 400 µl Puffer M sowie Glaskugeln bis zu einem Flüssigkeitsstand von 1 ml in das Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 2 min auf dem Vibrax bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt. Das Zellen-Glaskugel Gemisch wurde anschließend mit 1 ml Puffer versetzt und durch Schwenken gut durchmischt. Zur Abtrennung der Glaskugeln sowie ungelöster Bestandteile erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 1000 g. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zur Sedimentation der Mikrosomen für 15 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 50 µl Harnstoff-Puffer aufgenommen und für 10 min bei 42 °C inkubiert. Zur weiteren Analyse wurde die Probe bei -20 °C aufbewahrt oder mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunoblot analysiert.

### 4.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente zur Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteinprobe wurde mit einem SDS- oder Harnstoffprobenpuffer versetzt und in die Taschen eines 3%igen Acrylamid-Sammelgels aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe eines 6-18%igen Acrylamid-Trenngels in Abhängigkeit von der Größe der zu analysierenden Proteine. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 15 min mit 80 V und mit 120 V bis die Farbstofffront des Probenpuffers das Ende des Gels erreicht hatte. Der Nachweis der Proteine erfolgte entweder mittels spezifischer Antikörper im Immunoblot oder durch Anfärben mit Coomassie-Färbelösung.

### 4.2.2.4 Immunoblot (*Western Blotting*)

Um Proteine nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese spezifisch nachzuweisen wurde ein Immunoblot nach dem *Tank-Blot* Verfahren durchgeführt. Hierbei werden die Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes und eines Transferpuffers aus dem SDS-Polyacrylamidgel gelöst und auf einer geeigneten Membran immobilisiert. Dazu wurde das entsprechende Gel auf ein mit Transferpuffer befeuchtetes Whatman-Papier gelegt

und mit einer PVDF-Membran überschichtet. Die Membran wurde ebenfalls mit einem Whatman-Papier bedeckt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 250 mA für 60 bis 90 min. Nach der Immobilisierung wurde die Membran für 15 min bei Raumtemperatur in 10 % (w/v) Milchpulverlösung in 1x TBT-Puffer inkubiert um freie Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran zur Detektion eines bestimmten Proteins über Nacht bei 4 °C in der Antikörperlösung inkubiert. Für diese wurde der entsprechende Antikörper spezifisch in 5 % (w/v)-Milchpulver in 1x TBT-Puffer verdünnt. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x für 10 min bei Raumtemperatur mit 1x TBT-Puffer gewaschen und danach in einer 5 % (w/v)-Milchpulver-TBT-Lösung des sekundären Antikörpers für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion des sekundären Antikörpers erfolgte durch Zugabe einer ECL-Lösung nach Angaben des Herstellers und das Signal wurde mit Hilfe des Odyssey Fc detektiert. Die für Quantifizierungen verwendeten fluoreszierenden, sekundären Antikörper wurden durch Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge ebenfalls mit dem Odyssey Fc detektiert.

#### 4.2.2.5 Coomassie-Färbung

Zur unspezifischen Anfärbung der Proteine in einem SDS-PAGE Gel wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Dazu wurde das Gel zunächst für 30 min bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend erfolgte eine Entfärbung bis zum gewünschten Ergebnis mit Coomassie-Entfärbelösung. Das Gel wurde anschließend mehrmals mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und zur Aufbewahrung mit einem Gelrockner auf Whatmanpapier getrocknet.

#### 4.2.2.6 Amidoschwarzfärbung

Die Amidoschwarzfärbung wurde verwendet um die Proteine auf einer PVDF-Membran nach dem Western-Blot unspezifisch sichtbar zu machen. Dazu wurde die Membran zunächst für 10 min bei Raumtemperatur in der Färbelösung inkubiert. Anschließend erfolgte eine Entfärbung bis zum gewünschten Ergebnis in Entfärbelösung für 5 bis 10 min. Die Reaktion wurde durch Überführen der Membran in ddH<sub>2</sub>O abgestoppt und aufbewahrt.

#### 4.2.2.7 Immunopräzipitation unter nativen Bedingungen (Ko-IP)

Zur Präzipitation von HRD-Ligasekomponenten wurde eine Immunopräzipitation unter nativen Bedingungen in Anlehnung an Gauss *et al.* (2006) durchgeführt. Diejenige Komponente, die durch spezifische Antikörper gefällt werden sollte, wurde mit einem HA- oder Myc-Epitop markiert. Es wurde zunächst eine Übernachtvorkultur der Hefen in 50 ml YPD-Medium oder SD-Medium angesetzt. Am nächsten Morgen wurde damit eine Hauptkultur in 100 ml YPD- oder SD-Medium mit einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,25 (YPD-Medium) bzw. 0,4 (SD-Medium) angesetzt. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1,5 wurden 80 OD<sub>600</sub> Zellen durch Zentrifugieren für 2 min bei 2000 g geerntet und mit 40 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 1 ml IP15-Puffer (1,2x) aufgenommen und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Sedimentation der Zellen durch erneute Zentrifugation wurde das Zellpellet in 0,5 ml IP15-Puffer (1,2x) suspendiert und zur mechanischen Lyse mit Glaskugeln bis zur Höhe der 0,5 ml Markierung versetzt. Die Zellen wurden bei maximaler Geschwindigkeit im Vibrax für 2 min aufgeschlossen und anschließend mit 1 ml 1,2fachen IP(15)-Puffer verdünnt. Zelltrümmer und Glaskugeln wurden durch zentrifugieren für 5 min mit 1000 g sedimentiert und 900 µl des Überstandes in ein 1,5 ml

Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen. Die Membranfraktion wurde durch Zentrifugieren für 20 min bei 20.000 g pelletiert und die Membranproteine durch vorsichtiges pipettieren mit 1 ml IP15-Puffer (1x +1 % NP40) und einer Inkubation für 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad solubilisiert. Zur Abtrennung nicht solubilisierter Bestandteile erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 20.000 g. Dann wurden 900 µl des Überstandes in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl IP15-Puffer verdünnt. Außerdem wurde zur Kontrolle eine 50 µl Probe des Totallysates genommen und mit 25 µl 3x Probenpuffer versetzt. Zur Immunopräzipitation wurde das Lysat mit 20 µl ProteinA-Sepharose und 1 µl Epitop-spezifischem Antikörper versetzt und über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe dreimal mit 1 ml IP15-Puffer (1x) gewaschen und die Proteine durch Erwärmen für 15 min bei 65 °C mit 50 µl 2x Probenpuffer eluiert. Zur Analyse der präzipitierten Proteine erfolgte eine SDS-PAGE mit je 10 µl des Eluats und 20 µl der Totallysatkontrolle. Mit Hilfe spezifischer Antikörper erfolgte eine Detektion der Proteine im Immunoblot.

#### 4.2.2.8 Aufreinigung von Proteinen für die massenspektrometrische Analyse

Für den Nachweis möglicher Phosphorylierungen an den Positionen Ser374, Ser376 und Ser379 von Usa1 in Abhängigkeit der Ligasekomponente Hrd3 wurde Usa1 aus den Hefestämmen YTX636 und YTX625 immunopräzipitiert. Dazu wurde aus einer Übernachtskultur eine Hauptkultur aus 100 ml YPD-Medium mit einer Start-OD<sub>600</sub> inokuliert. Anschließend wurden 150 OD<sub>600</sub> Zellen bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von zwei geerntet. Der Zellaufschluss erfolgte durch mechanische Lyse wie im Abschnitt 4.2.3.8 beschrieben unter Verwendung denaturierender Pufferbedingungen. Allerdings wurden alle verwendeten Puffer und Lösungen unter Bewahrung besonderer Reinheit neu hergestellt und mit dem *Phosphatase Inhibitor Cocktail 3* (Sigma Aldrich #P0044) laut Herstellerangaben versetzt um eine Dephosphorylierung der Proteine zu verhindern. Zur Immunopräzipitation wurde der IP 0,01-Puffer und ein Myc-Epitop spezifischer Antikörper verwendet. Die Probe wurde durch Erhitzen in 50 µl 2x Probenpuffer von der ProteinA-Sepharose eluiert und zur Vorbereitung für den tryptischen Verdau in ein 12 % SDS-PAGE einlaufen gelassen.

#### 4.2.2.9 Massenspektrometrischer Nachweis der Usa1-Phosphorylierungen

Die für die massenspektrometrische Analyse aufgereinigte Proteinprobe wurde zur weiteren Analyse an Herrn Daniel Perez Hernandez von der MDC internen *Proteomics* Technologieplattform weitergegeben. Die von ihm durchgeführten massenspektrometrischen Experimente dienten dem Nachweis einer Phosphorylierung an S374, S376 und S379 von Usa1. Zur Analyse wurde ein *Q Exactive Orbitrap* Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) verwendet welches mit einem *nano EasyLC 1200* HPLC-System (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt war. Die tryptisch verdauten Peptide wurden auf eine selbst gepackte Reverse-Phase C18-Säule geladen (75 µm × 150 mm; ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 1.9 µm, Dr. Maisch GmbH) und mit einer Flussrate von 250 nL/min und einem Gradienten von 3 % zu 40 % B innerhalb 60 min aufgetrennt. Als Laufmittel wurden 0,1 % Ameisensäure (A) und 0,1 % Ameisensäure / 80 % Acetonitril (B) verwendet.

Für die *shotgun* Messungen wurde das Massenspektrometer so eingestellt das ein Total-MS Spektrum (300-1700 m/z) mit einer Auflösung von 70.000 erzielt wurde. Der Zielwert der automatischen Verstärkungsregelung (AGC) betrug 1x10<sup>6</sup>. Es wurden gezielt

geladene Peptide analysiert und mit einem Quadrupol Massefilter (2 m/z) isoliert. Die maximale Injektionszeit wurde auf 60 ms gesetzt. *Higher-energy collisional dissociation (HCD)* Fragmentierung wurde mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 26 % durchgeführt. Ausgewählte Ionen wurden dynamisch für 20 s isoliert.

Für *parallel reaction monitoring* (PRM) Experimente wurde die *HCD* Fragmentierung mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 30 % durchgeführt. Für ein Total-MS Spektrum mit einer Auflösung von 70.000 wurde der AGC-Wert auf  $2 \times 10^5$  eingestellt. Die maximale Injektionszeit betrug 250 ms bei einem Isolierungsbereich von 2 m/z. PRM Messungen wurden im *time scheduled mode* durchgeführt. Das Gerät wurde so eingestellt um das unmodifizierte Peptid, das einfach-phosphorylierte Peptid für die Positionen Ser374, 376 und 379 und das zweifach-phosphorylierte Peptid als Kombination dieser Positionen zu isolieren.

#### 4.2.2.10 Isolierung von RNA aus Hefe

Die Extraktion von RNA aus Hefezellen wurde in Anlehnung an das Herstellerprotokoll durchgeführt (Invitrogen; TRI<sup>TM</sup>zol Reagent #15596026). Es wurden 20 OD<sub>600</sub> logarithmisch wachsende Zellen in einem 15 ml Falcon Röhrchen geerntet und zunächst bei – 80 °C aufbewahrt. Das gefrorene Zellpellet wurde durch wiederholtes pipettieren nach Zugabe von 0,5 ml TRIzol gelöst. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zum Zellaufschluss durch mechanische Lyse wurden Glaskugeln entsprechend eines Volumen von 0,5 ml zur Suspension gegeben und für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit auf dem Vibrax inkubiert. Das Lysat wurde mit 2,5 ml TRIzol verdünnt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde Chloroform entsprechend eines Fünftels des vorhandenen Volumens zugegeben, durch vortexen vermischt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 5.000 g wurden zweimal 880 µl der oberen wässrigen Phase in je ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA wurde das Lysat mit 620 µl Isopropanol gut durchmischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA wurde durch Zentrifugieren für 10 min bei 12.000 g pelletiert und mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation von 5 min bei 8.000 g wurde das Pellet durch Inkubation für 1 min bei 55 °C getrocknet. Die RNA wurde in 80 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

Zum Verdau der DNA wurden 20 µl 5fach DNase-Puffer, 2 µl RNase-freie DNase (1 unit/ µl) und 5 µl SUPERase-In (20x, 20 u/ µl) zur RNA-Lösung gegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 90 µl RNase-freiem Natriumacetat (3 M) wurde die Lösung bis auf 900 µl mit DEPC-behandeltem Wasser aufgefüllt. Es erfolgte eine gute Durchmischung mit 300 µl der unteren Phase von wässrigem Phenol und anschließend mit 300 µl Chloroform durch vortexen. Danach wurde das Gemisch für 5 min bei 20.000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße übertragen in denen 500 µl Chloroform vorgelegt waren und gut durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase in Eppendorf-Reaktionsgefäße übertragen in denen 620 µl Isopropanol vorgelegt waren und durch Invertieren durchmischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g und 4 °C. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75 % DEPC-behandeltem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 8.000 g zentrifugiert. Nach dem Trocknen durch

Inkubieren für 1 min bei 55 °C wurde die RNA in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und die Konzentration der Lösung mit dem NanoDrop ermittelt. Die Probe wurde auf eine Konzentration von 1 µg/ µl eingestellt und bei – 80°C zur Lagerung eingefroren.

#### 4.2.2.11 cDNA Synthese aus RNA (reverse Transkription)

Die Synthese von cDNA anhand der isolierten Hefe-RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des *SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kits* (Invitrogen, #18080093). Es wurde ein 20 µl Reaktionsansatz gewählt, für den 4 µg der RNA eingesetzt wurden. Zunächst wurden 0,5 µl *random Hexamers* (400 ng/µl), 4 µl RNA (1 µg/µl), 1 µl dNTP-Mix (10 mM von jedem dNTP) und 7,5 µl DEPC-behandeltes Wasser in ein Mini-PCR-Reaktionsgefäß gefüllt und für 5 min bei 65 °C in einem PCR-Zykler inkubiert. Nach einem Kälteschock von 1 min auf Eis wurden die weiteren Komponenten des *Kits* (4 µl 5x Erst-Strang Puffer; 1 µl DTT; 1 µl SUPERase-In; 1 µl SuperScript III) zum Ansatz gegeben und zunächst für 5 min bei 55 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 50 °C für 55 min, gefolgt von 15 min bei 70 °C. Die Probe wurde auf 4 °C abgekühlt und eine PCR zur Anreicherung eines Hac1-spezifischen Produktes durchgeführt (siehe Anhang B)

### 4.2.3 Zellbiologische Methoden

#### 4.2.3.1 Kultivierung der Hefezellen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Hefezellen handelte es sich um Derivate des Stammes YWO1. Dieser Hefestamm zeichnet sich u.a. durch das Vorhandensein von bestimmten Aminosäureauxotrophien aus. Das bedeutet, dass die Hefen bestimmte essentielle Aminosäuren nicht selber synthetisieren können und daher auf eine externe Zufuhr angewiesen sind. Die Hefen wurden daher entweder in einem Vollmedium kultiviert (YPD-Medium) oder in einem synthetischen Minimalmedium, dem die entsprechenden Aminosäuren zugesetzt wurden (SD-Medium). Es kamen sowohl Flüssigmedien als auch feste Medien in Form von Agar-Platten zum Einsatz. Flüssigkulturen wurden für gewöhnlich in Erlenmeyerkolben bei 30 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Medium-Platten wurden für ein bis drei Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Eine längere Aufbewahrung der Hefen auf Medium-Platten erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank und unter Verschluss durch Parafilm. Hefen, die mit einem Hefep lasmid transformiert waren, wurden in Selektionsmedium ohne Zugabe der Aminosäure kultiviert, für dessen Synthese das benötigte Gen als Selektionsmarker auf dem Plasmid kodiert war. Dadurch wurde eine Weitergabe des Plasmids an Tochterzellen gewährleistet.

#### 4.2.3.2 Messung der optischen Dichte von Zellkulturen

Um das Wachstum von Hefe- und Bakterienkulturen in einem Flüssigmedium zu verfolgen, wurde die optische Dichte der Kultur als Maß für die Zelldichte herangezogen. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde die Extinktion einer Kultur in einer Küvette bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 600$  nm mit einem Photometer gemessen. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Messwert zwischen 0,2 und 0,8 lag. Wenn nötig wurden daher 1:5 oder 1:10 Verdünnungen eingesetzt.

#### 4.2.3.3 Einfügen genetischer Veränderungen durch homologe Rekombination (Sporulation und Tetradendisektion von Hefezellen)

Von zwei haploiden Hefestämmen mit den gewünschten genetischen Eigenschaften wurden zunächst Übernachtskulturen in 2,5 ml YPD-Medium in einem Reagenzglas angesetzt. Dabei war darauf zu achten, dass die zu kreuzenden Hefestämme unterschiedliche Paarungstypen aufwiesen. Am nächsten Morgen wurden je 500 µl der Kulturen zusammen in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einer sterilen Glaspipette gefüllt. Zur Belüftung der Hefen wurden mit Hilfe einer Kanüle zwei Löcher in den Deckel gestochen. Das Hefegemisch wurde für drei bis vier Stunden bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurden 300 µl dieser Kultur auf eine Selektionsplatte ausgestrichen und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Zur Anreicherung der erwünschten Rekombinationsereignisse wurden möglichst die Selektionsmarker verwendet, mit denen die entsprechenden genetischen Veränderung markiert waren.

Von den diploiden Hefen wurde eine Übernachtskultur in 2,5 ml YPD-Medium angesetzt. Davon wurden am nächsten Morgen 200 µl in 3 ml vorgelegtes Pre-Spo-Medium überführt und für 3 bis 4 Stunden bei 30 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Im Anschluss wurden 2 ml Hefekultur entnommen und zweimal mit ddH<sub>2</sub>O für 1 min bei 3000 rpm gewaschen. Das Zellpellet wurde in 3 ml Spo-Medium aufgenommen und für 3 bis 4 Tage bei 30 °C im Schüttelinkubator zur Sporulation kultiviert.

Zur Disektion der Tetraden wurde zunächst mit Hilfe eines Lichtmikroskops und einem Ölimmersionsobjektiv die Sporulation der Hefekultur überprüft. Waren Tetraden sichtbar, wurden 300 µl der Kultur in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Hefezellen durch Zentrifugation für 30 sec bei 3000 rpm sedimentiert. Diese Zellen wurden je nach Zelldichte in 0,3 bis 1 ml SED-Medium aufgenommen. In diesem Medium konnten die Tetraden bei 4 °C für mehrere Tage aufbewahrt werden. Um die Tetraden zu vereinzeln wurden 200 µl der Hefe-SED-Kultur mit 10 µl DTT (1 M) und 20 µl Zymolyase (10 mg/ml) vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sofort 10 µl des Ansatzes am Rand einer YPD-Platte ausplattiert. Die Tetraden wurden daraufhin mit einem Mikromanipulator in 4er Reihen einzeln abgelegt. Die Tetradenplatte wurde für 2 bis 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Charakterisierung des Genotyps der einzelnen Sporen erfolgte zunächst anhand der Auxotrophiemarker durch Wachstum auf entsprechenden Selektionsplatten. Abschließend wurden von geeigneten Sporen Hefekulturen angelegt, die dann mit Hilfe einer SDS-PAGE und folgendem Immunoblot auf die gewünschten Proteine analysiert wurden.

#### 4.2.3.4 Platten-Wachstumstest für Hefezellen

Für einen Wachstumstest von Hefen wurde zunächst eine Vorkultur der gewünschten Hefestämme über Nacht angesetzt. Bei genomisch integrierten Veränderungen wurden die Hefen dafür in 2 ml YPD-Medium in Reagenzgläsern angezogen. Bei mit Plasmid-transformierten Hefen wurden Erlenmeyerkolben mit 15 ml SD-Medium verwendet. Am nächsten Morgen wurden je 20 ml Hauptkulturen mit einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,2 (YPD-Medium) bzw. 0,4 (SD-Medium) angesetzt und bis zu einer OD von 1,5 bis 2 (YPD-Medium) bzw. 0,8 bis 1,2 (SD-Medium) bei 30 °C inkubiert. Es wurden 0,5 OD Zellen durch Zentrifugieren für 1 min bei 2000g geerntet und in 100 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Für den Wachstumstest wurde eine Verdünnungsreihe von fünf 1:5 Verdünnungen pro Hefestamm mit Hilfe einer 96-Well Platte hergestellt. Dazu wurden je 40 µl ddH<sub>2</sub>O in den benötigten Vertiefungen vorgelegt und mit 10 µl der vorherigen Verdünnungsstufe gut

durchmischt. Die Start-OD<sub>600</sub> betrug 0,5. Von jeder Verdünnung wurden dann 10 µl auf eine YPD- oder SD-Platte getropft. Die Platten wurden für 1 Tag (YPD) oder 3 Tage (SD-Platten) bei 30 °C inkubiert und abschließend mit Hilfe einer Fotokamera dokumentiert. Für einen Wachstumstest mit Induktion von ER-Stress durch DTT oder Tunicamycin wurden die verwendeten Platten mit diesen Chemikalien versetzt. Für DTT-haltige Platten wurde YPD-Agar bis auf Handwärme abgekühlt und DTT (1 M) zum flüssigen Medium gegeben um auf eine Endkonzentration von 5 mM, 10 mM oder 15 mM DTT zu kommen. Für Tunicamycin-haltige Platten wurden SD-Platten mit der Chemikalie beschichtet, sodass 0,1 µg/ml oder 0,2 µg/ml haltige Platten erhalten wurden. Für einen Wachstumstest bei erhöhter Temperatur wurden die Hefe-Platten bei 37 °C für 3 Tage inkubiert.

#### 4.2.3.5 Farbttest zum Nachweis der vakuolären Peptidase CPY

Die mutierte Form der vakuolären Peptidase CPY, CPY\*, ist ein gut etabliertes ERAD-Substrat. Um zu überprüfen ob ein Hefestamm über die nicht-veränderte, aktive Enzymvariante CPY oder über die genetisch manipulierte und dadurch inaktive Variante CPY\* verfügt, wurde ein Farbttest durchgeführt. Dieser basiert auf der Spaltung der Amidbindung von *N*-Benzoyl-*L*-Tyrosin-*p*-Nitroanilid durch die aktive Form CPY. Als Reaktionsprodukt entsteht das gelbe *p*-Nitroanilin. Zur Durchführung des Farbttests wurden je zu überprüfender Hefekultur 200 µl steril gefilterter CPY-Farbttest-Puffer in eine Vertiefung einer 96 Well-Platte pipettiert. In diese Lösung wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers etwas Zellmaterial der Hefekultur einer Platte überführt. Das Ganze wurde luftdicht bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen zeigte eine gelbe Verfärbung der Lösung die Anwesenheit eines aktiven CPY-Enzyms an, während eine klare Lösung auf das Vorhandensein der inaktiven Variante CPY\* hindeutete.

#### 4.2.3.6 Cycloheximid-Abbauxperiment

Cycloheximid hemmt die Proteintranslation, sodass eine Neusynthese von Proteinen verhindert wird und der Abbau der bestehenden Proteine über die Zeit analysiert werden kann. Von den zu analysierenden Hefestämmen wurde zunächst eine Übernachtskultur in 20 ml SD-Medium angeimpft. Mit dieser wurde am nächsten Morgen eine Hauptkultur in 40 ml SD-Medium und einer OD<sub>600</sub> von 0,4 angesetzt, die bis zur Verdopplung für ca. 4 h bei 30 °C im Schüttelinkubator inkubiert wurde. Pro gewünschtem Zeitpunkt wurden 5 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet. Die Ernte erfolgte in einem 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß durch Zentrifugieren für 2 min bei 4°C und 3000 rpm. Zum Lösen des Zellpellets wurden pro Zeitpunkt 1 ml SD-Medium verwendet und die Zellen zur Regeneration für 5 min im 30 °C warmen Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 0,33 mg/ml Cycloheximid zu den Kulturen wurde das Experiment gestartet. Es wurden unmittelbar zu Beginn und dann zu den gewünschten Zeitpunkten je 1 ml Proben entnommen und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis überführt in dem 500 µl Natriumazid (30 mM) und 1 mM PMSF vorgelegt waren. Die Proben wurden gut durchmischt und nach Entnahme des letzten Zeitpunkts für 30 sec bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 100 µl CHX-Aufschlusspuffer und einem Eppendorfreaktionsgefäßdeckel voll Glaskugeln für 2 min mit dem Vibrax. Die Lysate wurden jeweils mit 100 µl 3x Probenpuffer versetzt und für 15 min bei 65 °C und 500 rpm im Thermoblock inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 12 min bei 14.000 rpm wurden je Zeitpunkt 50 µl Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Je nach zu untersuchendem Protein wurden 10 bis 15 µl Probe pro Zeitpunkt für eine SDS-PAGE verwendet und mit einem



Immunoblot analysiert. Zur Quantifizierung wurden die Programme Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) und Microsoft Excel verwendet.

#### 4.2.3.7 *Pulse-Chase-Experiment*

Mit Hilfe des *Pulse-Chase-Experiments* wurde der Abbau von radioaktiv-markierten Proteinen verfolgt. Dafür wurden in gleicher Weise, wie bei einem CHX-Experiment 5 OD<sub>600</sub> logarithmisch wachsende Zellen pro gewünschtem Zeitpunkt und pro Hefestamm geerntet. Das Zellpellet wurde in 800 µl SD-Medium aufgenommen und zur Regeneration für 5 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. In der Zwischenzeit wurden für jeden Hefestamm 3,5 ml *Chase-Medium* in 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt. Zur radioaktiven Markierung neusynthetisierter Proteine wurden anschließend 3 MBq S<sup>35</sup> *Protein labeling Mix* zur Zellsuspension pipettiert und diese für 8 min bei 30 °C inkubiert (*Pulse*). Die Zellen wurden für 15 sec bei 10.000 rpm sedimentiert und sofort mit dem vorgewärmten *Chase-Medium* gemischt. Es wurde schnellstmöglich der 0-Zeitwert abgenommen und dann entsprechend der gewünschten Zeitpunkte auch die anderen Proben. Dazu wurde je 1 ml Zellsuspension entnommen und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert in dem 500 µl eiskaltes Natriumazid (30 mM) und 1 mM PMSF vorgelegt waren. Die Proben wurden im Anschluss für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit einer Hamilton-Pipette entfernt. Es wurden 100 µl Aufschlusspuffer sowie ein Deckel eines Eppendorf-Reaktionsgefäßes voll Glaskugeln zum Zellpellet gegeben. Der Aufschluss erfolgte durch heftiges Schütteln für 3 min im Vibrax. Anschließend wurde 1 ml IP-Verdünnungspuffer zum Lysat gegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer 20 minütigen Zentrifugation bei 20.000 g wurden 900 µl des Überstandes in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß übertragen und für eine Immunopräzipitation verwendet. Dazu wurden je 100 µl ProteinA-Sepharose-Antikörpermix (15 µl mit IP-Puffer äquilibrierte ProteinA-Sepharose™4FastFlow und 1 µl Antikörper) zur Probe gegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Sepharose-Beads zweimal mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen und der Überstand mit einer Hamilton Pipette vollständig entfernt. Für eine SDS-PAGE wurden die Proben mit 20 µl 2x Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Es erfolgte eine Beladung kleiner Taschen eines Polyacrylamidgels mit je 15 µl der Proben. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel zur Fixierung der Proteine für ca. 10 min in 10 % Essigsäure inkubiert und anschließend gründlich mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Detektion der Proteine mittels Autoradiografie wurde das Gel nach dem Trocknen mit Hilfe eines Geltrockners über Nacht auf eine *Phosphorimager*-Platte gelegt. Das Auslesen der Signale erfolgte an einem Typhoon (FLA- 9500). Für die anschließende Quantifizierung wurden die Programme Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) und Microsoft Excel verwendet.

#### 4.2.3.8 Zielgerichtetes *in vivo photo-crosslinking*

Das zielgerichtete *in vivo photo-crosslinking* wurde basierend auf dem Protokoll von Mehnert (2012) durchgeführt. Zum Quervernetzen von Hrd1 wurde der *crosslinker* pBPA durch eine spezifische tRNA-Synthetase und eine modifizierte Suppressor-tRNA an eine gewählte Position von Hrd1 integriert. Die Gene für die tRNA-Synthetase und die Suppressor-tRNA wurden basierend auf dem Plasmid pGK1-pBpA in die verwendeten Hefen transformiert. Zur Steigerung der Crosslinking Effizienz wurde auch das Plasmid pSNR getestet. Bei den verwendeten Hefestämmen handelte es sich um *hrd1*-Deletionsstämme und Derivate davon. Alle Hrd1-Varianten wurden ebenfalls Plasmid-basiert exprimiert und verfügten zur späteren Fällung über ein C-terminales 3xHA- oder

3xMyc-Epitop. Für die Durchführung des Experiments nach Mehnert (2012) wurde eine 250 ml Hefekultur über Nacht mit dem Crosslinker pBPA inkubiert und 2 h vor der Ernte eine Überexpression von Hrd1 durch Zugabe von  $\text{CuSO}_4$  induziert. Es wurden 150  $\text{OD}_{600}$  Zellen geerntet, gewaschen und als 2 ml Zellsuspension in die Kavität einer 6-Loch Platte pipettiert. In dieser 6-Loch Platte wurden die Hefen für 45 min auf Eis mit UV-Licht bestrahlt. Pro Experiment konnten daher maximal sechs verschiedene Hefestämme untersucht werden. Zur Kontrolle wurde parallel ein ähnlicher Ansatz ohne UV-Bestrahlung auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und durch mechanische Lyse unter denaturierenden Bedingungen mit dem IP-(0,01)-Puffer aufgeschlossen. Es folgte eine Immunopräzipitation von Hrd1 mit ProteinA-Sepharose und Epitop-spezifischen Antikörpern über Nacht. Nach dem Waschen der Sepharose-Beads erfolgte eine Elution der Proteine durch Erhitzen für 10 min bei 65 °C in 50  $\mu\text{l}$  Probenpuffer (2x). Eine Quervernetzung zu HRD-Ligaseproteinen oder zu ERAD-Substraten wurde durch eine Analyse der Proben mittels SDS-PAGE und Immunoblot untersucht. Zur Detektion von Quervernetzungen zum Substrat wurde eine mit einem 13xMyc-Epitop markierte CPY\*-Variante verwendet, die mit einem Myc-spezifischem Antikörper detektiert wurde.

#### 4.2.3.9 Unspezifisches chemisches *crosslinking in vivo*

Zum unspezifischen Quervernetzen der HRD-Ligase-Komponenten wurde der membranpermeable Crosslinker DSS (Thermo Scientific; #21658) entsprechend der Vorgehensweise von Carvalho, Stanley, & Rapoport (2010) und den Herstellerangaben verwendet. Es wurde eine 40 ml Übernachtskultur der entsprechenden Hefestämme in SD-Medium angezogen. Mit dieser wurde eine 100 ml Hauptkultur mit einer Start- $\text{OD}_{600}$  von 0,4 in SD-Medium inokuliert. Es wurden 80  $\text{OD}_{600}$  Zellen in einem 50 ml Falcon-Röhrchen durch Zentrifugieren für 2 min bei 2000 g geerntet. Das Pellet wurde schrittweise zweimal in 20 ml bzw. 10 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen und dabei in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Zur Zelllyse wurden die Zellen in 1 ml Puffer A aufgenommen und Glaskugeln bis 0,5 ml unter dem Flüssigkeitsstand zugegeben. Der Aufschluss erfolgte bei maximaler Geschwindigkeit für 3 min mit dem Vibrax. Das Lysat wurde mit 1 ml Puffer A verdünnt und für 3 min bei 2000 g zentrifugiert. Zur Sedimentation der Membranfraktion wurden 1,5 ml des Überstands in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 20 min bei 20.000 g zentrifugiert. Das Membranpellet wurde in 1,5 ml DSS-Solubilisierungspuffer aufgenommen und für 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Nicht-solubilierte Bestandteile wurden durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 20.000 g pelletiert. Vom Überstand wurden zunächst 50  $\mu\text{l}$  als Totallysatkontrolle mit 50  $\mu\text{l}$  2x Probenpuffer versetzt. Für das Experiment wurde 1 ml des Überstandes in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 10  $\mu\text{l}$  DSS (25 mM) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Tris-HCl (1 M) für 15 min bei Raumtemperatur abgestoppt. Anschließend erfolgte eine Immunopräzipitation des Epitop-markierten Hrd1 durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  ProteinA-Sepharose und 1,5  $\mu\text{l}$  Epitop-spezifischem Antikörper. Der Ansatz wurde mit 900  $\mu\text{l}$  DSS-Puffer verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 3x mit DSS-Puffer gewaschen und die Proteine durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  2x Probenpuffer durch Erhitzen für 10 min bei 65 °C eluiert. Die Analyse der quervernetzten, höhermolekularen Proteinspezies erfolgte per SDS-PAGE und Immunoblot mit spezifischen Antikörpern. Dazu wurden je 10  $\mu\text{l}$  Eluat in eine Tasche eines 4 – 12 % Gradientengels aufgetragen und bis zum Auslaufen der Farbstofffront bei 80 V aufgetrennt.

---

## Literaturverzeichnis

- Aebi, M, Bernasconi, R, Clerc, S, and Molinari, M (2010). N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci* 35, 74–82.
- Agarraberes, FA, and Dice, JF (2001). Protein translocation across membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1513, 1–24.
- Aguirre, JD, Dunkerley, KM, Mercier, P, and Shaw, GS (2017). Structure of phosphorylated UBL domain and insights into PINK1-orchestrated parkin activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 298–303.
- Albuquerque, CP, Smolka, MB, Payne, SH, Bafna, V, Eng, J, and Zhou, H (2008). A Multidimensional Chromatography Technology for In-depth Phosphoproteome Analysis. *Mol Cell Proteomics* 7, 1389–1396.
- van Anken, E, Pincus, D, Coyle, S, Aragón, T, Osman, C, Lari, F, Gómez Puerta, S, Korennykh, A V, and Walter, P (2014). Specificity in endoplasmic reticulum-stress signaling in yeast entails a step-wise engagement of HAC1 mRNA to clusters of the stress sensor Ire1. *Elife* 3, e05031.
- Bagola, K, von Delbrück, M, Dittmar, G, Scheffner, M, Ziv, I, Glickman, MH, Ciechanover, A, and Sommer, T (2013). Ubiquitin binding by a CUE domain regulates ubiquitin chain formation by ERAD E3 ligases. *Mol Cell* 50, 528–539.
- Balchin, D, Hayer-Hartl, M, and Hartl, FU (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* 353, aac4354.
- Baldrige, RD, and Rapoport, TA (2016). Autoubiquitination of the Hrd1 Ligase Triggers Protein Retrotranslocation in ERAD. *Cell* 166, 394–407.
- Barros-Barbosa, A, Ferreira, MJ, Rodrigues, TA, Pedrosa, AG, Grou, CP, Pinto, MP, Fransen, M, Francisco, T, and Azevedo, JE (2019). Membrane topologies of PEX13 and PEX14 provide new insights on the mechanism of protein import into peroxisomes. *FEBS J* 286, 205–222.
- Benko, E (2007). Untersuchungen zum ER-assoziierten Proteinabbau (ERAD) in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Technische Universität Berlin.
- Berg, B van den, Clemons, WM, Collinson, I, Modis, Y, Hartmann, E, Harrison, SC, and Rapoport, TA (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427, 36–44.
- Biederer, T, Volkwein, C, and Sommer, T (1996). Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 15, 2069–2076.
- Biederer, T, Volkwein, C, and Sommer, T (1997). Role of Cue1p in Ubiquitination and Degradation at the ER Surface. *Science (80- )* 278, 1806–1809.
- Blom, N, Sicheritz-Pontén, T, Gupta, R, Gammeltoft, S, and Brunak, S (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4, 1633–1649.
- Bodnar, N, and Rapoport, T (2017a). Toward an understanding of the Cdc48/p97 ATPase. *F1000Research* 6, 1318.
- Bodnar, NO, Kim, KH, Ji, Z, Wales, TE, Svetlov, V, Nudler, E, Engen, JR, Walz, T, and Rapoport, TA (2018). Structure of the Cdc48 ATPase with its ubiquitin-binding cofactor

---

Ufd1–Npl4. *Nat Struct Mol Biol* 25, 1–7.

Bodnar, NO, and Rapoport, TA (2017b). Molecular Mechanism of Substrate Processing by the Cdc48 ATPase Complex. *Cell* 169, 722–735.e9.

Braakman, I, and Buleid, NJ (2011). Protein Folding and Modification in the Mammalian Endoplasmic Reticulum. *Annu Rev Biochem* 80, 71–99.

Buetow, L, Gabrielsen, M, Anthony, NG, Dou, H, Patel, A, Aitkenhead, H, Sibbet, GJ, Smith, BO, and Huang, DT (2015). Activation of a Primed RING E3-E2–Ubiquitin Complex by Non-Covalent Ubiquitin. *Mol Cell* 58, 297–310.

Byrd, JC, Tarentino, AL, Maley, F, Atkinson, PH, and Trimble, RB (1982). Glycoprotein synthesis in yeast. Identification of Man8GlcNAc2 as an essential intermediate in oligosaccharide processing. *J Biol Chem* 257, 14657–14666.

Cannon, JF, Gitan, R, and Tatchell, K (1990). Yeast cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit mutations display a variety of phenotypes. *J Biol Chem* 265, 11897–11904.

Carroll, SM, and Hampton, RY (2010). Usa1p is required for optimal function and regulation of the Hrd1p endoplasmic reticulum-associated degradation ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 285, 5146–5156.

Carvalho, P, Goder, V, and Rapoport, TA (2006). Distinct Ubiquitin-Ligase Complexes Define Convergent Pathways for the Degradation of ER Proteins. *Cell* 126, 361–373.

Carvalho, P, Stanley, AM, and Rapoport, TA (2010). Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p. *Cell* 143, 579–591.

Chakrabarti, KS, Li, J, Das, R, and Byrd, RA (2017). Conformational Dynamics and Allostery in E2:E3 Interactions Drive Ubiquitination: gp78 and Ube2g2. *Struct Des* 25, 794–805.e5.

Chen S, Schultz PG, BA (2007). An improved system for the generation and analysis of mutant proteins containing unnatural amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 371, 112–122.

Chen, X, Randles, L, Shi, K, Tarasov, SG, Aihara, H, and Walters, KJ (2016). Structures of Rpn1 T1:Rad23 and hRpn13:hPLIC2 Reveal Distinct Binding Mechanisms between Substrate Receptors and Shuttle Factors of the Proteasome. *Structure* 24, 1257–1270.

Cherry, JM et al. (2012). *Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast*. *Nucleic Acids Res* 40, D700–D705.

Christianson, TW, Sikorski, RS, Dante, M, Shero, JH, and Hieter, P (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors.

Collins, GA, and Goldberg, AL (2017). The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* 169, 792–806.

Corpet, F (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16, 10881–10890.

Deak, PM, and Wolf, DH (2001). Membrane topology and function of Der3/Hrd1p as a ubiquitin-protein ligase (E3) involved in endoplasmic reticulum degradation. *J Biol Chem* 276, 10663–10669.

von Delbrück, M, Kniss, A, Rogov, V V, Gü, P, Sommer, T, Dö, V, Pluska, L, Bagola, K, Lö Hr, F, and Dö Tsch, V (2016). The CUE Domain of Cue1 Aligns Growing Ubiquitin

---

Chains with Ubc7 for Rapid Elongation.

Delley, CL, Müller, AU, Ziemski, M, and Weber-Ban, E (2017). Prokaryotic Ubiquitin-Like Protein and Its Ligase/Deligase Enzymes. *J Mol Biol* 429, 3486–3499.

Deshaies, RJ, and Schekman, R (1987). A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 105, 633–645.

Egner, R, Rosenthal, FE, Kralli, A, Sanglard, D, and Kuchler, K (1998). Genetic Separation of FK506 Susceptibility and Drug Transport in the Yeast Pdr5 ATP-binding Cassette Multidrug Resistance Transporter. *Mol Biol Cell* 9, 523–543.

Farré, J-C, Mahalingam, SS, Proietto, M, and Subramani, S (2018). Peroxisome biogenesis, membrane contact sites, and quality control. *EMBO Rep* 20, e46864.

Fei, W, Wang, H, Fu, X, Bielby, C, and Yang, H (2009). Conditions of endoplasmic reticulum stress stimulate lipid droplet formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 424, 61–67.

Fiebigler, E, Story, C, Ploegh, HL, and Tortorella, D (2002). Visualization of the ER-to-cytosol dislocation reaction of a type I membrane protein. *EMBO J* 21, 1041–1053.

Finley, D, Ulrich, HD, Sommer, T, and Kaiser, P (2012). The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192, 319–360.

Foster, BM, Stolz, P, Mulholland, CB, Montoya, A, Kramer, H, Bultmann, S, and Bartke, T (2018). Critical Role of the UBL Domain in Stimulating the E3 Ubiquitin Ligase Activity of UHRF1 toward Chromatin. *Mol Cell* 72, 739–752.e9.

Friedlander, R, Jarosch, E, Urban, J, Volkwein, C, and Sommer, T (2000). A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded- protein response. *Nat Cell Biol* 2, 379–384.

Gardner, RG, Swarbrick, GM, Bays, NW, Cronin, SR, Wilhovsky, S, Seelig, L, Kim, C, and Hampton, RY (2000). Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling: Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. *J Cell Biol* 151, 69–82.

Garza, RM, Sato, BK, and Hampton, RY (2009). In vitro analysis of Hrd1p-mediated retrotranslocation of its multispinning membrane substrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase. *J Biol Chem* 284, 14710–14722.

Gauss, R, Jarosch, E, Sommer, T, and Hirsch, C (2006). A complex of Yos9p and the HRD ligase integrates endoplasmic reticulum quality control into the degradation machinery. *Nat Cell Biol* 8, 849–854.

Giampieri, C (2010). Medicina para y por residentes. *Salud(i)Ciencia* 17, 482.

Goldknopf, IL, French, MF, Musso, R, and Busch, H (1977). Presence of protein A24 in rat liver nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5492–5495.

Greenblatt, EJ, Olzmann, JA, and Kopito, RR (2011). Derlin-1 is a rhomboid pseudoprotease required for the dislocation of mutant  $\alpha$ -1 antitrypsin from the endoplasmic reticulum. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1147–1152.

Ham, SJ, Young Lee, S, Song, S, Chung, JR, Choi, S, and Chung, J (2016). Interaction between RING1 (R1) and the ubiquitin-like (UBL) domains is critical for the regulation of parkin activity. *J Biol Chem* 291, 1803–1816.

Hebert, DN, and Molinari, M (2012). Flagging and docking: dual roles for N-glycans in

---

protein quality control and cellular proteostasis. *Trends Biochem Sci* 37, 404–410.

Hershko, A, Heller, H, Elias, S, and Ciechanover, A (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 258, 8206–8214.

Hiller, MM, Finger, A, Schweiger, M, and Wolf, DH (1996). ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273, 1725–1728.

Holt, LJ, Tuch, BB, Villen, J, Johnson, AD, Gygi, SP, and Morgan, DO (2009). Global Analysis of Cdk1 Substrate Phosphorylation Sites Provides Insights into Evolution. *Science* (80- ) 325, 1682–1686.

Horn, SC, Hanna, J, Hirsch, C, Volkwein, C, Schütz, A, Heinemann, U, Sommer, T, and Jarosch, E (2009). Usa1 Functions as a Scaffold of the HRD-Ubiquitin Ligase. *Mol Cell* 36, 782–793.

Hosomi, A, Fujita, M, Tomioka, A, Kaji, H, and Suzuki, T (2016). Identification of PNGase-dependent ERAD substrates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 473, 3001–3012.

Hwang, J, and Qi, L (2018). Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci* 43, 593–605.

Janke, C et al. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947–962.

Jarosch, E, Taxis, C, Volkwein, C, Bordallo, J, Finley, D, Wolf, DH, and Sommer, T (2002). Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* 4, 134–139.

Jungmann, J, Reins, HA, Schobert, C, and Jentsch, S (1993). Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature* 361, 369–371.

Kelley, LA, Mezulis, S, Yates, CM, Wass, MN, and Sternberg, MJE (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10, 845–858.

Kimata, Y, Ishiwata-Kimata, Y, Yamada, S, and Kohno, K (2006). Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. *Genes to Cells* 11, 59–69.

Kimata, Y, Oikawa, D, Shimizu, Y, Ishiwata-Kimata, Y, and Kohno, K (2004). A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J Cell Biol* 167, 445–456.

Knop, M, Finger, A, Braun, T, Hellmuth, K, and Wolf, DH (1996). Dera, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast.

Knop, M, Siegers, K, Pereira, G, Zachariae, W, Winsor, B, Nasmyth, K, and Schiebel, E (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963–972.

Köhler, A (2015). Die Rolle der Mannosidase Htm1p beim ER- - assoziierten Abbau von Glykoproteinen.

Komander, D, and Rape, M (2012). The Ubiquitin Code. *Annu Rev Biochem* 81, 203–229.

Kreutzberger, A, Ji, M, Aaron, J, Mihaljević, L, and Urban, S (2019). Rhomboid distorts lipids to break the viscosity-imposed speed limit of membrane diffusion. *Science* 363, eaao0076.

- 
- Li, L, Park, E, Ling, J, Ingram, J, Ploegh, H, and Rapoport, TA (2016). Crystal structure of a substrate-engaged SecY protein-translocation channel. *Nature* 531, 395–399.
- Liang, R-Y, Chen, L, Ko, B-T, Shen, Y-H, Li, Y-T, Chen, B-R, Lin, K-T, Madura, K, and Chuang, S-M (2014). Rad23 interaction with the proteasome is regulated by phosphorylation of its ubiquitin-like (Ubl) domain. *J Mol Biol* 12, 4049–4060.
- Lin, JH, Li, H, Yasumura, D, Cohen, HR, Zhang, C, Panning, B, Shokat, KM, LaVail, MM, and Walter, P (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* (80-) 318, 944–949.
- Longtine, MS, McKenzie, a, Demarini, DJ, Shah, NG, Wach, a, Brachat, a, Philippsen, P, and Pringle, JR (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953–961.
- Lorenz, S, Cantor, AJ, Rape, M, and Kuriyan, J (2013). Macromolecular juggling by ubiquitylation enzymes. *BMC Biol* 11, 65.
- McCaffrey, K, and Braakman, I (2016). Protein quality control at the endoplasmic reticulum. *Essays Biochem* 60, 227–235.
- Medicherla, B, Kostova, Z, Schaefer, A, and Wolf, DH (2004). A genomic screen identifies Dsk2p and Rad23p as essential components of ER-associated degradation. *EMBO Rep* 5, 692–697.
- Mehnert, M (2013). Die Funktion der HRD-Ubiquitinligase bei der Protein- Dislokation aus dem Endoplasmatischen Retikulum.
- Mehnert, M, Sommer, T, and Jarosch, E (2010). ERAD ubiquitin ligases. *BioEssays* 32, 905–913.
- Mehnert, M, Sommer, T, and Jarosch, E (2014). Der1 promotes movement of misfolded proteins through the endoplasmic reticulum membrane. *Nat Cell Biol* 16, 77–86.
- Mehnert, M, Sommermeyer, F, Berger, M, Kumar Lakshmi, S, Gauss, R, Aebi, M, Jarosch, E, and Sommer, T (2015). The interplay of Hrd3 and the molecular chaperone system ensures efficient degradation of misfolded secretory proteins. *Mol Biol Cell* 26, 185–194.
- Meinecke, M, Cizmowski, C, Schliebs, W, Krüger, V, Beck, S, Wagner, R, and Erdmann, R (2010). The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nat Cell Biol* 12, 273–277.
- Montilla-Martinez, M, Beck, S, Klümper, J, Meinecke, M, Schliebs, W, Wagner, R, and Erdmann, R (2015). Distinct Pores for Peroxisomal Import of PTS1 and PTS2 Proteins. *Cell Rep* 13, 2126–2134.
- Neal, S, Jaeger, PA, Duttke, SH, Benner, C, K Glass, C, Ideker, T, and Hampton, RY (2018). The Dfm1 Derlin Is Required for ERAD Retrotranslocation of Integral Membrane Proteins. *Mol Cell* 69, 306–320.e4.
- Neal, SE, Mak, R, Bennett, EJ, and Hampton, R (2017). A “Retrochaperone” Function for Cdc48: the Cdc48 Complex is Required for Retrotranslocated ERAD-M Substrate Solubility. *J Biol Chem*, jbc.M116.770610.
- Neuber, O, Jarosch, E, Volkwein, C, Walter, J, and Sommer, T (2005). Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* 7, 993–998.

---

Oda, Y, Okada, T, Yoshida, H, Kaufman, RJ, Nagata, K, and Mori, K (2006). Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J Cell Biol* 172, 383–393.

Patil, C, and Walter, P (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 13, 349–355.

Pedrosa, AG, Francisco, T, Bicho, D, Dias, AF, Barros-Barbosa, A, Hagmann, V, Dodt, G, Rodrigues, TA, and Jorge Azevedo, XE (2018). Peroxisomal monoubiquitinated PEX5 interacts with the AAA ATPases PEX1 and PEX6 and is unfolded during its dislocation into the cytosol.

Pereira, F, Rettel, M, Stein, F, Savitski, MM, Collinson, I, and Römisch, K (2019). Effect of Sec61 interaction with Mpd1 on endoplasmic reticulum-associated degradation. *PLoS One* 14, e0211180.

Pfeiffer, A, Stephanowitz, H, Krause, E, Volkwein, C, Hirsch, C, Jarosch, E, and Sommer, T (2016). A Complex of Htm1 and the Oxidoreductase Pdi1 Accelerates Degradation of Misfolded Glycoproteins. *J Biol Chem* 291, 12195–12207.

Pickart, CM (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503–533.

Pilla, E, Schneider, K, and Bertolotti, A (2017). Coping with Protein Quality Control Failure. *Annu Rev Cell Dev Biol* 33, 439–465.

Pilon, M, Schekman, R, and Römisch, K (1997). Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J* 16, 4540–4548.

Plempner, RK, Böhmeler, S, Bordallo, J, Sommer, T, and Wolf, DH (1997). Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388, 891–895.

Pobre, KFR, Poet, GJ, and Hendershot, LM (2018). The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends. *J Biol Chem*, jbc.REV118.002804.

Pruneda, JN, Littlefield, PJ, Soss, SE, Nordquist, KA, Chazin, WJ, Brzovic, PS, and Klevit, RE (2012). Structure of an E3:E2~Ub Complex Reveals an Allosteric Mechanism Shared among RING/U-box Ligases. *Mol Cell* 47, 933–942.

Römisch, K (2016). A Case for Sec61 Channel Involvement in ERAD. *Trends Biochem Sci* xx, 1–9.

Ruggiano, A, Foresti, O, and Carvalho, P (2014). Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol* 204, 869–879.

Sakata, E et al. (2003). Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO Rep* 4, 301–306.

Sato, BK, and Hampton, RY (2006). Yeast Derlin Dfm1 interacts with Cdc48 and functions in ER homeostasis. *Yeast* 23, 1053–1064.

Sato, BK, Schulz, D, Do, PH, and Hampton, RY (2009). Misfolded membrane proteins are specifically recognized by the transmembrane domain of the Hrd1p ubiquitin ligase. *Mol Cell* 34, 212–222.



- 
- Schäfer, A, and Wolf, DH (2009). Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *EMBO J* 28, 2874–2884.
- Schindelin, J et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682.
- Schoebel, S et al. (2017). Cryo-EM structure of the protein-conducting ERAD channel Hrd1 in complex with Hrd3. *Nature*.
- Schuberth, C, and Buchberger, A (2005). Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* 7, 999–1006.
- Senft, D, and Ronai, ZA (2015). UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci* 40, 141–148.
- Seufert, W, and Jentsch, S (1990). Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J* 9, 543–550.
- Seufert, W, and Jentsch, S (1991). Yeast ubiquitin-conjugating enzymes involved in selective protein degradation are essential for cell viability. *Acta Biol Hung* 42, 27–37.
- Seufert, W, McGrath, JP, and Jentsch, S (1990). UBC1 encodes a novel member of an essential subfamily of yeast ubiquitin-conjugating enzymes involved in protein degradation. *EMBO J* 9, 4535–4541.
- Sikorski, RS, and Hieter, P (1989). A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in. *Genetics* 122, 19–27.
- Sommer, T, and Jentsch, S (1993). A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* 365, 176–179.
- Stevenson, J, Huang, EY, and Olzmann, JA (2016). Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and Lipid Homeostasis. *Annu Rev Nutr* 36, 511–542.
- Stolz, A, Schweizer, RS, Schäfer, A, and Wolf, DH (2010). Dfm1 Forms Distinct Complexes with Cdc48 and the ER Ubiquitin Ligases and Is Required for ERAD. *Traffic* 11, 1363–1369.
- Swatek, KN, and Komander, D (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res* 26, 399–422.
- Tamaki, H (2007). Glucose-stimulated cAMP-protein kinase a pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* 104, 245–250.
- Thevelein, JM, and de Winder, JH (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 33, 904–918.
- Vashist, S, and Ng, DTW (2004). Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* 165, 41–52.
- Vashistha, N, Neal, SE, Singh, A, Carroll, SM, and Hampton, RY (2016). Direct and essential function for Hrd3 in ER-associated degradation. *Proc Natl Acad Sci*, 201603079.
- Walter, J, Urban, J, Volkwein, C, and Sommer, T (2001). Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p. *EMBO J* 20, 3124–3131.
- Walter, P, and Gardner, BM (2011). Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands That Directly Induce the Unfolded Protein Response. *Science* (80- ) 333, 1891–1894.

---

Walter P, and Ron D (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* (80- ) 334, 1081–1086.

Wang, Q, and Wang, L (2008). New Methods Enabling Efficient Incorporation of Unnatural Amino Acids in Yeast. *J Am Chem Soc* 130, 6066–6067.

Woelk, T, Sigismund, S, Penengo, L, and Polo, S (2007). The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div* 2, 11.

Wu, X, and Rapoport, TA (2018). Mechanistic insights into ER-associated protein degradation. *Curr Opin Cell Biol* 53, 22–28.

Xu, C, and Ng, DTW (2015). Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 742–752.

Yagishita, N et al. (2005). Essential role of synoviolin in embryogenesis. *J Biol Chem* 280, 7909–7916.

Ye, Y, Baek, S-H, Ye, Y, and Zhang, T (2018). Proteomic characterization of endogenous substrates of mammalian ubiquitin ligase Hrd1. *Cell Biosci* 8, 46.

Ye, Y, Meyer, HH, and Rapoport, TA (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol* 162, 71–84.

Ye, Y, Tang, WK, Zhang, T, and Xia, D (2017). A Mighty “Protein Extractor” of the Cell: Structure and Function of the p97/CDC48 ATPase. *Front Mol Biosci* 4, 39.

# Anhang A Hefen, Plasmide, Oligonukleotide

**Tabelle 1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme.**

Name	Genotyp	Quelle/Referenz
YSK02	<i>CPY*-13xMyc (TRP1), hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK03	<i>CPY*-13xMyc (TRP1), ubc7C89S, hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK04	<i>CPY*-13xMyc (TRP1), hrd3Δ::LEU2, hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK05	<i>CPY*-13xMyc (TRP1), hrd3Δ769-833::kanMX6, hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK07	<i>CPY*-13xMyc (TRP1), HRD3<sub>K652I, R653L</sub>, hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK09	<i>CPY*-13xMyc (TRP1), ubx2Δ::TRP1, hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK10	<i>CPY*-13xMyc (TRP1), ubx2Δ::TRP1, der1Δ::HIS3, hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK11	<i>CPY*-13xMyc (TRP1), ubx2Δ::TRP1, usa1Δ::kanMX6, hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK12	<i>CPY*-13xMyc (TRP1), ubx2Δ::TRP1, cue1Δ::HIS3, hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK13	<i>CPY*-13xMyc (TRP1), ubx2Δ::TRP1, TEV-HRD3 (natNT2), hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK14	<i>CPY*-13xMyc (TRP1), der1Δ::HIS3, hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK15	<i>CPY-13xMyc (kanMX6), hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK16	<i>hrd1Δ::TRP1, pdr5Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK18	<i>CPY*-3xHA (kanMX6), hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK19	<i>CPY-3xHA (HIS3), hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK21	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1<sub>H101K</sub> (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK22	<i>his3-11,-15, trp1-1(am), CUP-PRA*-4xMyc (HIS3)</i>	diese Arbeit
YSK23	<i>his3-11,-15, CUP-PRA*-4xMyc (HIS3), hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK24	<i>CPY*-3xHA (kanMX6), TEV-HRD3 (natNT2), hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK26	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1<sub>E84L, H101L</sub> (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK27	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1 (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK28	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::URA3</i>	diese Arbeit
YSK29	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1<sub>K119L</sub> (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK30	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1<sub>Q206L</sub> (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK31	<i>sec61-2, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1<sub>E84L, H101L</sub> (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK32	<i>sec61-2, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1 (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK33	<i>sec61-2, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::URA3</i>	diese Arbeit

Name	Genotyp	Quelle/Referenz
YSK34	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1 (URA3), his3-11,-15::GAPDH-6xMyc-HMG2 (HIS3)</i>	diese Arbeit
YSK35	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1<sub>E84L, H101L</sub> (URA3), his3-11,-15::GAPDH-6xMyc-HMG2 (HIS3)</i>	diese Arbeit
YSK36	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, his3-11,-15::GAPDH-6xMyc-HMG2 (HIS3)</i>	diese Arbeit
YSK37	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1<sub>H101D</sub> (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK38	<i>prc1, trp1-1(am), his3-11,-15, hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK40	<i>prc1-1, 6xHA-HRD3, ubc7C89S, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1 (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK41	<i>prc1-1, 6xHA-HRD3, ubc7C89S, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::URA3</i>	diese Arbeit
YSK42	<i>prc1-1, 6xHA-HRD3, ubc7C89S, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1<sub>S34L, F35L</sub> (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK43	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1<sub>H101L, F105L</sub> (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK44	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1<sub>P87A</sub> (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK45	<i>hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1<sub>E84L, H101L</sub> (URA3), ire1Δ::LEU2</i>	diese Arbeit
YSK46	<i>hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1 (URA3), ire1Δ::LEU2</i>	diese Arbeit
YSK47	<i>hrd1Δ::TRP1, ura3-52::URA3, ire1Δ::LEU2</i>	diese Arbeit
YSK48	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1<sub>E84L, H101L</sub> (URA3), ire1Δ::His3</i>	diese Arbeit
YSK49	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::Hrd1 (URA3), ire1Δ::His3</i>	diese Arbeit
YSK50	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::URA3, ire1Δ::His3</i>	diese Arbeit
YSK51	<i>hrd1Δ::TRP1, pdr5Δ::TRP1, ura3-52::HRD1<sub>E84L, H101L</sub> (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK52	<i>hrd1Δ::TRP1, pdr5Δ::TRP1, ura3-52::HRD1 (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK53	<i>hrd1Δ::TRP1, pdr5Δ::TRP1, ura3-52::URA3</i>	diese Arbeit
YSK56	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, lys2-801::HRD1 (LYS2)</i>	diese Arbeit
YSK57	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, lys2-801::HRD1<sub>E84L, H101L</sub> (LYS2)</i>	diese Arbeit
YSK58	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, lys2-801::LYS2</i>	diese Arbeit
YSK60	<i>prc1-1, 3xMyc-HRD3, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1 (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK61	<i>prc1-1, 3xMyc-HRD3, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::URA3</i>	diese Arbeit
YSK62	<i>prc1-1, Δhrd1::TRP1, USA1-3xMyc(kanMX6), ura3-52::HRD1<sub>E84L, H101L</sub> (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK63	<i>prc1-1, Δhrd1::TRP1, USA1-3xMyc(kanMX6), ura3-52::HRD1 (URA3)</i>	diese Arbeit
YSK64	<i>prc1-1, Δhrd1::TRP1, USA1-3xMyc(kanMX6), ura3-52::URA3</i>	diese Arbeit
YSK65	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, ura3-52::HRD1<sub>E84L, H101L</sub> (URA3)</i>	diese Arbeit

Name	Genotyp	Quelle/Referenz
YSK66	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, lys2-801::HRD1-3xHA(kanMX6)(LYS2)</i>	diese Arbeit
YSK67	<i>prc1-1, hrd1Δ::TRP1, lys2-801::HRD1<sub>E84L, H101L</sub>-3xHA(kanMX6)(LYS2)</i>	diese Arbeit
YSK69	<i>hrd1Δ::TRP1, lys2-801::HRD1 (LYS2)</i>	diese Arbeit
YSK70	<i>hrd1Δ::TRP1, lys2-801::HRD1<sub>E84L, H101L</sub> (LYS2)</i>	diese Arbeit
YSK71	<i>hrd1Δ::TRP1, lys2-801::LYS2</i>	diese Arbeit
YSK72	<i>prc1-1, ubc7<sub>C89S</sub>, Δder1::HIS3, CPY*-3xHA (kanMX6), hrd1Δ::TRP1</i>	diese Arbeit
YSK73	<i>prc1-1, ubc7<sub>C89S</sub>, Δder1::HIS3, CPY*-3xHA (kanMX6), hrd1Δ::TRP1, lys2-801::HRD1 (LYS2)</i>	diese Arbeit
YSK74	<i>prc1-1, ubc7<sub>C89S</sub>, Δder1::HIS3, CPY*-3xHA (kanMX6), hrd1Δ::TRP1, lys2-801::HRD1<sub>E84L, H101L</sub> (LYS2)</i>	diese Arbeit
YTX1252	<i>Δhrd1::TRP1, prc1-1</i>	Sommer Labor
YTX140	<i>prc1-1</i>	Biederer <i>et al.</i> , 1997
YJU96	<i>Δhrd1::TRP1, sec61-2</i>	Walter <i>et al.</i> , 2001
YTX150	<i>sec61-2</i>	Walter <i>et al.</i> , 2001
YTX1251	<i>trp1Δ1, his3-11,15</i>	Sommer Labor
YTX573	<i>prc1-1, 6xHA-Hrd3, ubc7<sub>C89S</sub></i>	Sommer Labor
YTX574	<i>prc1-1, 6xHA-Hrd3, ubc7<sub>C89S</sub>, hrd1Δ::TRP1</i>	Sommer Labor
YTX636	<i>prc1-1, Δhrd3::LEU2, USA1-3xMyc (kanMX6)</i>	Sommer Labor
YTX625	<i>prc1-1, USA1-3xMyc (kanMX6)</i>	Sommer Labor
YTX1158	<i>prc1-1, Δubc4::TRP, Δhrd1::TRP</i>	Sommer Labor
YTX1159	<i>prc1-1, Δubc4::TRP1, Δubc7::LEU2, Δhrd1::TRP</i>	Sommer Labor
YTX231	<i>Δhrd1::TRP1, Δubc6::LEU2</i>	Sommer Labor
YTX331	<i>prc1-1, Δhrd1::TRP1, Δubc1::HIS3</i>	Sommer Labor

**Tabelle 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.**

Plasmid	Ausgangs-plasmid	Beschreibung	Quelle
pSK21	pTX209	CUP-Hrd1 S34L	diese Arbeit
pSK22	pTX209	CUP-Hrd1 F35L	diese Arbeit
pSK23	pTX209	CUP-Hrd1 L40A	diese Arbeit
pSK24	pTX209	CUP-Hrd1 E44L	diese Arbeit
pSK25	pTX209	CUP-Hrd1 E84L	diese Arbeit
pSK26	pTX209	CUP-Hrd1 H101L	diese Arbeit
pSK27	pTX209	CUP-Hrd1 F35A	diese Arbeit
pSK28	pTX209	CUP-Hrd1 E44A	diese Arbeit
pSK29	pTX209	CUP-Hrd1 E84A	diese Arbeit
pSK30	pTX209	CUP-Hrd1 H101A	diese Arbeit
pSK31	pTX209	CUP-Hrd1 K267E	diese Arbeit
pSK34	pTX209	CUP-Hrd1 S34L/F35L-3xHA	diese Arbeit
pSK42	pRS403	CUP-PRA*-Myc	Sommer Labor
pSK53	pTX209	CUP-Hrd1 S34L/F35L/C399S-3xHA	diese Arbeit
pSK56	pMD001	Hrd1 H101L	diese Arbeit
pSK57	pMD001	Hrd1 E84L	diese Arbeit
pSK58	pMD001	Hrd1 K267E	diese Arbeit
pSK64	pMD001	Hrd1 F35L	diese Arbeit
pSK69	pTX209	CUP-Hrd1-13xMyc	diese Arbeit
pSK70	pMD001	Hrd1 E84L/H101L	diese Arbeit
pSK72	pTX301	Usa1 S298E	diese Arbeit
pSK73	pTX301	Usa1 S298A	diese Arbeit
pSK85	pSK56	Hrd1 H101LF105A	diese Arbeit
pSK86	pTX301	Usa1 WT	diese Arbeit
pSK87	pSK86	Usa1 S293E/S298E	diese Arbeit
pSK88	pSK86	Usa1 S293A/S298A	diese Arbeit
pSK89	pMD001	Hrd1 P87A	diese Arbeit
pSK90	pMD001	Hrd1 K119L	diese Arbeit
pSK91	pMD001	Hrd1 Q206L	diese Arbeit
pSK92	pMD001	Hrd1 E78L/E84L	diese Arbeit
pSK93	pCL083	Hrd1 S34L/F35L	diese Arbeit
pSK94	pSK93	Hrd1 S34L/F35L/R400A	diese Arbeit
pSK95	pTX301	Usa1 S374A/S376A/S379A	diese Arbeit

Plasmid	Ausgangs-plasmid	Beschreibung	Quelle
pSK96	pTX301	Usa1 S374E/S376E/S379E	diese Arbeit
pSK97	pTX301	Usa1 S374D/S376D/S379D	diese Arbeit
pSK98	pMD001	Hrd1 S34L	diese Arbeit
pSK103	pMD001	Hrd1 H101D	diese Arbeit
pSK104	pMD001	Hrd1 H101K	diese Arbeit
pSK106	pMD001	Hrd1	diese Arbeit
pSK107	pSK106	Hrd1 E84L/H101L	diese Arbeit
pSK108	pSK106	Hrd1 E84L	diese Arbeit
pMM076	pRS413	PRA*-3xHA	Sommer Labor
pTX209	pRS416	CUP-Hrd1-3xHA(KanMX6)	Sommer Labor
pTX238	pRS416	Hrd1 WT	Benko, 2007
pTX301	pRS416	Usa1 WT (von DF5)	Sommer Labor
pRH244		GAPDH-6xMyc-Hmg2	R. Hampton
pMD001	pRS406	Hrd1 (WT Promotor)	Sommer Labor
pWO0667	pRS316	CTL*	Medicherla <i>et al.</i> , 2004
pSM101		KWW-HA	Vashist and Ng, 2004
pDR5*pcKSF1-26		PDR5*	Egner <i>et al.</i> , 1998
Crosslinking Plasmide			
pSK01	pTX209	CUP-Hrd1 S32STOP	diese Arbeit
pSK02	pTX209	CUP-Hrd1 F35STOP	diese Arbeit
pSK03	pTX209	CUP-Hrd1 L40STOP	diese Arbeit
pSK04	pTX209	CUP-Hrd1 E44STOP	diese Arbeit
pSK05	pTX209	CUP-Hrd1 F71STOP	diese Arbeit
pSK06	pTX209	CUP-Hrd1 L176STOP	diese Arbeit
pSK07	pTX209	CUP-Hrd1 F83STOP	diese Arbeit
pSK08	pTX209	CUP-Hrd1 L86STOP	diese Arbeit
pSK10	pTX209	CUP-Hrd1 I91STOP	diese Arbeit
pSK11	pTX209	CUP-Hrd1 F95STOP	diese Arbeit
pSK12	pTX209	CUP-Hrd1 F100STOP	diese Arbeit
pSK13	pTX209	CUP-Hrd1 H101STOP	diese Arbeit
pSK14	pTX209	CUP-Hrd1 F105STOP	diese Arbeit
pSK15	pTX209	CUP-Hrd1 V108STOP	diese Arbeit
pSK16	pTX209	CUP-Hrd1 F111STOP	diese Arbeit

---

Plasmid	Ausgangs- plasmid	Beschreibung	Quelle
pSK19	pTX209	CUP-Hrd1 L118STOP	diese Arbeit
pSK20	pTX209	CUP-Hrd1 F121STOP	diese Arbeit
pSK32	pTX209	CUP-Hrd1 I169STOP	diese Arbeit
pSK33	pTX209	CUP-Hrd1 I172STOP	diese Arbeit
pSK35	pTX209	CUP-Hrd1 T520STOP	diese Arbeit
pSK36	pTX209	CUP-Hrd1 G531STOP	diese Arbeit
pSK37	pTX209	CUP-Hrd1 D545STOP	diese Arbeit
pSK38	pTX209	CUP-Hrd1 F404STOP	diese Arbeit
pSK39	pTX209	CUP-Hrd1 F415STOP	diese Arbeit
pSK40	pTX209	CUP-Hrd1 E337STOP	diese Arbeit
pSK41	pTX299	CUP-Hrd1 I91STOP C399S-3xHA	diese Arbeit
pSK43	pTX298	CUP-Hrd1 I91STOP -13xMyc	diese Arbeit
pSK44	pTX209	CUP-Hrd1 F13STOP	diese Arbeit
pSK45	pTX209	CUP-Hrd1 L19STOP	diese Arbeit
pSK46	pTX209	CUP-Hrd1 F22STOP	diese Arbeit
pSK47	pTX209	CUP-Hrd1 F54STOP	diese Arbeit
pSK48	pTX209	CUP-Hrd1 L57STOP	diese Arbeit
pSK49	pTX209	CUP-Hrd1 L61STOP	diese Arbeit
pSK50	pTX209	CUP-Hrd1 F150STOP	diese Arbeit
pSK51	pTX209	CUP-Hrd1 F152STOP	diese Arbeit
pSK52	pTX209	CUP-Hrd1 L156STOP	diese Arbeit
pSK54	pTX209	CUP-Hrd1 L197STOP	diese Arbeit
pSK55	pTX209	CUP-Hrd1 L201STOP	diese Arbeit
pSK74	pSK69	CUP-Hrd1 E44STOP-13xMyc	diese Arbeit
pSK75	pSK69	CUP-Hrd1 L86STOP-13xMyc	diese Arbeit
pSK76	pSK69	CUP-Hrd1 I91STOP-13xMyc	diese Arbeit
pSK77	pSK69	CUP-Hrd1 F95STOP-13xMyc	diese Arbeit
pSK78	pSK69	CUP-Hrd1 F193STOP-13xMyc	diese Arbeit
pSK79	pTX209	CUP-Hrd1 H81STOP-3xHA	diese Arbeit
pSK80	pTX209	CUP-Hrd1 N92STOP-3xHA	diese Arbeit
pSK81	pTX209	CUP-Hrd1 K119STOP-3xHA	diese Arbeit
pSK82	pTX209	CUP-Hrd1 L126STOP-3xHA	diese Arbeit
pSK83	pTX209	CUP-Hrd1 E192STOP-3xHA	diese Arbeit
pSK84	pTX209	CUP-Hrd1 Q206STOP-3xHA	diese Arbeit



Plasmid	Ausgangs-plasmid	Beschreibung	Quelle
pSK99	pTX209	CUP-Hrd1 D302STOP-3xHA	diese Arbeit
pSK100	pTX209	CUP-Hrd1 D282STOP-3xHA	diese Arbeit
pSK101	pTX209	CUP-Hrd1 D279STOP-3xHA	diese Arbeit
pSK102	pTX209	CUP-Hrd1 D275STOP-3xHA	diese Arbeit
pSK105	pSK40	CUP-Hrd1 E337STOP/C399S	diese Arbeit
pSK62	pRS317	CPY*	diese Arbeit
pSK63	pRS317	CPY*8Met	diese Arbeit
pSK65	pRS317	CPY*4Met	diese Arbeit
pSNR_Leu	pSNR_Trp	tRNA und tRNA Synthetase für pBPA	diese Arbeit
pGK1-BPA		tRNA und tRNA Synthetase für pBPA	Chen et. al 2007

**Tabelle 3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.**

Oligo-nukleo-tid	Bezeichnung	Sequenz	Referenz
SK029	Sequenzierprimer Hrd1	TCATATGGATAGGATCCTGC	diese Arbeit
SK030	Sequenzierprimer Hrd1	CAATATCATATAGAAGTCATCG	diese Arbeit
SK031	Sequenzierprimer Hrd1	TGAAGGCTTCAATCTAATGG	diese Arbeit
SK067	Sequenzierprimer Hrd1	CCATTTAGGATGCCTATGATGC	diese Arbeit
KB68	Sequenzierprimer Hrd1	AAAGCGGCCGCTTAGACAGGCAATCTAC AAATAGG	Sommer Labor
SK116	Sequenzierprimer für Usa1	CGAACAGAATTCACATATCG	diese Arbeit
SK032	leu2 Amplifizierung aus pRS415	ATCTCTAGACTACCCTATGAACATATTCC	diese Arbeit
SK033		AATGCGGCCGCATTTCTCAACAAGTAATT GG	diese Arbeit
SK038	Mutageneseprimer für Hrd1 H101L	CTGTGAAAAAATACCGTTCGAGGAACAG TGAGGACATAAAC	diese Arbeit
SK039		GTTTATGTCCTCACTGTTCTCGAACGGT ATTTTTTCACAG	diese Arbeit
SK040	Mutageneseprimer für Hrd1 E84L	ATGGTAAATGGTAACCTTAAAAAATGTG CTCATGCTCAATAAGCCTCAG	diese Arbeit
SK041		CTGAGGCTTATTGAGCATGAGCACATTTT TTTAAGGTTACCATTACCAT	diese Arbeit
SK042	Mutageneseprimer für Hrd1 L40A	GATTGAAGCCTTCATTTAGCTTCGCTGTT ACTTGCAAAAAGGAAACGC	diese Arbeit

Oligo- nukleo- tid	Bezeichnung	Sequenz	Referenz
SK043		GCGTTTCCTTTTTGCAAGTAACAGCGAAG CTAAATGAAGGCTTCAATC	diese Arbeit
SK044	Mutageneseprimer für Hrd1 F35L	TTCAGTGTTACTTGCAATAAGGAAACGCT TGTCTTGGTG	diese Arbeit
SK045		CACCAAGACAAGCGTTTCCTTATTGCAAG TAACACTGAA	diese Arbeit
SK046	Mutageneseprimer für Hrd1 E44L	CCATTAGATTGAAGCCTAAATTTAGCTTC AGTGTTACTTGCAAAAAGGAAAC	diese Arbeit
SK047		GTTTCCTTTTTGCAAGTAACACTGAAGCT AAATTTAGGCTTCAATCTAATGG	diese Arbeit
SK048	Mutageneseprimer für Hrd1 S34L	CTTCAGTGTTACTTGCAAAAATAAAACGC TTGTCTTGGTGGCTG	diese Arbeit
SK048		CAGCCACCAAGACAAGCGTTTTATTTTGG CAAGTAACACTGAAG	diese Arbeit
SK057	F1-Primer zur usa1 Deletion mittels pFA6a-kanMX	ATAAAGTGTTCATATACACCCTTCACCAAA TACGCAACATGCGGATCCCCGGGTTAAT TAA	diese Arbeit
SK058	R1-Primer zur usa1 Deletion mittels pFA6a-kanMX	GTCTTCATCAGGAATGTAGAGATGAGGT TGCGCACCTGTGGGAATTCGAGCTCGTT TAAAC	diese Arbeit
SK059	Mutageneseprimer für Hrd1 H101A	CTGTGAAAAAATACCGTTCTGCGAACAGT GAGGACATAAAC	diese Arbeit
SK060		GTTTATGTCCTCACTGTTTCGCAGAACGGT ATTTTTTCACAG	diese Arbeit
SK061	Mutageneseprimer für Hrd1 E84A	ATGGTAAATGGTAACCTTGCAAAAATGTG CTCATGCTCAATAAGCCTCAG	diese Arbeit
SK062		CTGAGGCTTATTGAGCATGAGCACATTTT TGCAAGGTTACCATTTACCAT	diese Arbeit
SK063	Mutageneseprimer für Hrd1 F35A	TTCAGTGTTACTTGCAATGCGGAAACGCT TGTCTTGGTG	diese Arbeit
SK064		CACCAAGACAAGCGTTTCCGCATTGCAA GTAACACTGAA	diese Arbeit
SK065	Mutageneseprimer für Hrd1 E44A	CCATTAGATTGAAGCCTGCATTTAGCTTC AGTGTTACTTGCAAAAAGGAAAC	diese Arbeit
SK066		GTTTCCTTTTTGCAAGTAACACTGAAGCT AAATGCAGGCTTCAATCTAATGG	diese Arbeit
SK068	Mutageneseprimer für Hrd1 K267E	GACAATTTACCGGCCTGGAGGGAGAATT CATGTATGAAAAGCAATTGAC	diese Arbeit
SK069		GTCAATTGCTTTTTTCATACATGAATTCTC CCTCCAGGCCGGTAAATTGTC	diese Arbeit
SK074	Mutageneseprimer für Hrd1 S34LF35L	GCCACCAAGACAAGCGTTTTGTTGTTGC AAGTAACACTGAAGC	diese Arbeit
SK075		GCTTCAGTGTTACTTGCAACAACAAAACG CTTGTCTTGGTGGC	diese Arbeit

Oligo- nukleo- tid	Bezeichnung	Sequenz	Referenz
SK093	Deletion von Hrd1 durch Ura3-Kassette ( <i>K. lactis</i> ) mittels pUG72	ACCTTACTATGGCAACTCCTAACGAACT ATTATTTGGTGAAGCTGCAGCTGAAGCTTC GTACGC	diese Arbeit
SK093		TAGCATAGACAAATGAAGTGCCGTTTTTA AGAATCTTGTGAATACGCATAGGCCACTA GTGGATCTG	diese Arbeit
SK094	Methionin Integration in CPY* an Aminosäure 43, 45, 47, 50	GCTGCGGAAAAATTTGGTATGGACATGG ACATGGATCATATGTTGAAGGAGTTGGA CTCC	diese Arbeit
SK094		GGAGTCCAACCTCCTTCAACATATGATCCA TGTCCATGTCCATACCAAATTTTTCCGCA GC	diese Arbeit
SK095	Methionin Integration in CPY* an Aminosäure 400, 403, 405, 408	CTACGTCAAAGAAGCTGTCATGGCGGAG ATGGACATGTACGAAATGTGTAACCTTCGA TATC	diese Arbeit
SK095		GATATCGAAGTTACACATTTTCGTACATGT CCATCTCCGCCATGACAGCTTCTTTGAC GTAG	diese Arbeit
SK108	Mutageneseprimer für Hrd1 C399S	CGTTCTCAGACTTGTCTATTTCTAGATT GCCTGTCTTTGATGAAAAAGG	diese Arbeit
SK109		CCTTTTTTCATCAAAGACAGGCAATCTAGA AATAGGACAAGTCTGAGAACG	diese Arbeit
SK110	Mutageneseprimer für Usa1 S374D/S376D/S379 D	CCAATTCATGCCTCCAGATACAAGGGAT CAGGATCCTGTTGATTTGCTCCGACGC AAGG	diese Arbeit
SK111		CCTTGCGTCGGAGCGAAATCAACAGGAT CCTGATCCCTTGTATCTGGAGGCATGAA TTGG	diese Arbeit
SK112	Mutageneseprimer für Usa1 S374A/S376A/S379A	CCAATTCATGCCTCCAGATACAAGGGCT CAGGCTCCTGTTGCTTTGCTCCGACGC AAGG	diese Arbeit
SK113		CCTTGCGTCGGAGCGAAAGCAACAGGA GCCTGAGCCCTTGTATCTGGAGGCATGA ATTGG	diese Arbeit
SK119	Mutageneseprimer für Usa1 S374E/S376E/S379E	CCAATTCATGCCTCCAGATACAAGGGAA CAGGAACCTGTTGAATTGCTCCGACGC AAGG	diese Arbeit

Oligo- nukleo- tid	Bezeichnung	Sequenz	Referenz
SK120		CCTTGCCTCGGAGCGAATTCAACAGGTT CCTGTTCCCTTGTATCTGGAGGCATGAAT TGG	diese Arbeit
SK121	Mutageneseprimer für Usa1 S293E/S298E	GTGAAAGATTTTCATATGTGAAGTTTACAC TCACGAATTAACTTGAGGAGAAATGATA TC	diese Arbeit
SK122		GATATCATTCTCCTCAAGTTTAATTCGT GAGTGTAACCTTCACATATGAAATCTTTC AC	diese Arbeit
SK123	Mutageneseprimer für Usa1 S293A/S298A	GTGAAAGATTTTCATATGTGCCGTTTACAC TCACGCCTTAACTTGAGGAGAAATGATA TC	diese Arbeit
SK124		GATATCATTCTCCTCAAGTTTAAGGCGT GAGTGTAACCGGCACATATGAAATCTTTC AC	diese Arbeit
SK125	Mutageneseprimer für Usa1 S298E	GTGAAAGATTTTCATATGTTCTGTTTACAC TCACGCCTTAACTTGAGGAGAAATGATA TC	diese Arbeit
SK126		GATATCATTCTCCTCAAGTTTAAGGCGT GAGTGTAACAGAACATATGAAATCTTTC AC	diese Arbeit
SK127	Mutageneseprimer für Hrd1 F105A	CACTGTTTCGCAGAACGGTATGCATTCAC AGTGGCATTCTTTTGGAC	diese Arbeit
SK128		GTCCAAAAAATGCCACTGTGAATGCATAC CGTTCTGCGAACAGTG	diese Arbeit
SK129	Mutageneseprimer für Hrd1 F105A/F106A	CACTGTTTCGCAGAACGGTATGCAGCAAC AGTGGCATTCTTTTGGAC	diese Arbeit
SK129		GTCCAAAAAATGCCACTGTTGCTGCATAC CGTTCTGCGAACAGTG	diese Arbeit
SK130	Mutageneseprimer für Hrd1 S298A	CATATGTTCTGTTTACACTCACGCATTAA ACTTGAGGAGAAATG	diese Arbeit
SK131		CATTTCTCCTCAAGTTTAATGCGTGAGTG TAAACAGAACATATG	diese Arbeit
SK154	Mutageneseprimer für Hrd1 K119L	GGACTATTACTACTCTATCTGTTAGTTTT CCATTGGATTTTAAAGG	diese Arbeit
SK155		CCTTTAAAATCCAATGGAAAATAACAGA TAGAGTAGTAATAGTCC	diese Arbeit
SK156	Mutageneseprimer für Hrd1 Q206L	GATTTGCTAAATTTATTCCTATTAATTGT TTGAATTTCTGGG	diese Arbeit
SK157		CCCAGAAATTCAAACAAGTTAATAGGAAT AAATTTAGCAAATC	diese Arbeit

Oligo-nukleotid	Bezeichnung	Sequenz	Referenz
SK158	Mutageneseprimer für Hrd1 K282L	GCAATTGACGTATTCACAAGATTCTTATT AACGGCACTTCATTTGTCTATGC	diese Arbeit
SK159		GCATAGACAAATGAAGTGCCGTTAATAA GAATCTTGTGAATACGTCAATTGC	diese Arbeit
SK160	Mutageneseprimer für Hrd1 P78A	GCATGAGCACATTTTTGAAAGGTTAGCAT TTACCATTATAAACACC	diese Arbeit
SK161		GGTGTTTATAATGGTAAATGCTAACCTTT CAAAAATGTGCTCATGC	diese Arbeit
SK166	F1-Primer für Hrd1 für Longline Plasmide	CATCTATCAATTGCAATTTGTAAGAGAAG GGGAGAAAGACAAAATAATAATCGGATC CCCGGGTTAATTAA	diese Arbeit
SK167	R1-Primer für Hrd1 für Longline Plasmide	CCAGTAGTTTTTTTCTTTAAAAAAACTAT GTATAATATAAACATGCAATGAATTCTGA GCTCGTTTAAAC	diese Arbeit
SK172	F2 Primer für Hrd1 für Longline Plasmide	CGAGCAAATTGCCAAGAAAATTGTCATAC CAGATAAATTTATCCAGCATATCCGGATC CCCGGGTTAATTAA	diese Arbeit
SK170	Primer zur Integration von Leu2 in pSNR mittels homologer Rekombination	GAGAATTGATCTTTTATGCTTGCTTTTCA AAAGGCTTGCAGAAATTCCTACCCTATGAA CATATTCCATTTTG	diese Arbeit
SK171		CGTCTTCAAGAATTAATTCGGTTCGAAAAA AGAAAAGGAGAGGGGCTAGCAACTGTG GGAATACTCAGGTATCG	diese Arbeit
SK173	Mutageneseprimer für Hrd1 H101D	CTGTGAAAAAATACCGTTCATCGAACAGT GAGGACATAAAC	diese Arbeit
SK174		GTTTATGTCCTCACTGTTTCGATGAACGGT ATTTTTTCACAG	diese Arbeit
SK175	Mutageneseprimer für Hrd1 H101K	CTGTGAAAAAATACCGTTCCTTGAACAGT GAGGACATAAAC	diese Arbeit
SK176		GTTTATGTCCTCACTGTTCAAAGAACGGT ATTTTTTCACAG	diese Arbeit
SK177	Primer für cDNA zum Nachweis von Hac1	ACGACGCTTTTGTTGCTTCT	diese Arbeit
SK178		TCTTCGGTTGAAGTAGCACAC	diese Arbeit

## Anhang B PCR-Programme und Ansätze

Einfügen von DNA-Mutationen mit der *Pfu Ultra™ HF* DNA-Polymerase

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Initialdenaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	} 18
Hybridisierung	55 °C	1 min	
Elongation	68 °C	18 min	
Finale Elongation	68 °C	10 min	1

Vervielfältigen von DNA mit der *Phusion® HF* DNA-Polymerase

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Initialdenaturierung	95 °C	4 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	} 30
Hybridisierung	53-56 °C	45 sec	
Elongation	72 °C	3 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

### PCR-Ansätze

Kolonie-PCR (Hefe)	PCR für Longtine Plasmide	<i>Pfu Ultra™ HF</i> PCR
10 µl 5x <i>Phusion™ HF</i> Puffer	10 µl 5x <i>Phusion™ HF</i> Puffer	5 µl 10x <i>Pfu Ultra™ HF</i> Puffer
1 µl dNTPs (200 µM)	1 µl dNTPs (200 µM)	1 µl dNTPs (200 µM)
5 µl Oligonukl. fw (5 µM)	4 µl Oligonukl. fw (5 µM)	6 µl Oligonukl. fw (2,5 µM)
5 µl Oligonukl. rv (5 µM)	4 µl Oligonukl. rv (5 µM)	6 µl Oligonukl. rv (2,5 µM)
2 µl DNA Lösung	1 µl DNA Lösung	200 ng DNA
1,5 µl DMSO (100 % v/v)	-	-
1 µl <i>Phusion HF</i> Polym.	1 µl <i>Phusion HF</i> Polym.	1 µl <i>Pfu Ultra™ HF</i> Polymerase
auffüllen auf 50 µl mit ddH <sub>2</sub> O	auffüllen auf 100 µl mit ddH <sub>2</sub> O	auffüllen auf 50 µl mit ddH <sub>2</sub> O

---

<b>PCR an cDNA (Hac1 Nachweis)</b>	<b>Sonstige PCR mit <i>Phusion™ HF</i> Polymerase</b>
10 µl 5x <i>Phusion™ HF</i> Puffer	10 µl 5x <i>Phusion™ HF</i> Puffer
1 µl dNTPs (200 µM)	1 µl dNTPs (200 µM)
3 µl Oligonukl. fw (5 µM)	5 µl Oligonukl. fw (5 µM)
3 µl Oligonukl. rv (5 µM)	5 µl Oligonukl. rv (5 µM)
1 µl cDNA Lösung	2 ng/µl DNA
1 µl <i>Phusion HF</i> Polym.	0,5 µl <i>Phusion HF</i> Polym.
auffüllen auf 50 µl mit ddH <sub>2</sub> O	auffüllen auf 50 µl mit ddH <sub>2</sub> O

---

# Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (1 Å = 0,1 nm)
AAA	<i>ATPase Associated with a variety of cellular Activities</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BiP	Binding Immunoglobulin Protein
Bp	Basenpaare
Cdc48	<i>Cell Division Cycle</i>
cDNA	complementary DNA
CHX	Cycloheximid
CPY	Carboxypeptidase Y
CPY*	fehlgefaltete Carboxypeptidase Y (G255R)
CUE1	<i>Coupling of Ubiquitin conjugation to Endoplasmic reticulum degradation</i>
ddH <sub>2</sub> O	zweifach deionisiertes Wasser
Der1	<i>Degradation in the Endoplasmic Reticulum</i>
Dfm1	<i>Der1-like family member</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
Doa10	Degradation of Mat $\alpha$ 10
DTT	Dithiothreitol
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitinligase
<i>E. coli</i>	<i>Eschericia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Proteindegradation
5-FOA	5-Fluoruracil-4-carbonsäure
fw	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
Glc	Glucose/ Glucosyl-
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HA	Hämagglutinin
Hac1	<i>Homologous to Atf/Creb1</i>
HECT	<i>Homologous to E6AP Carboxy-Terminus</i>
Hmg2	<i>3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A reductase 2</i>
Hrd1	<i>Hmg-CoA Reductase Degradation 1</i>
Hrd3	<i>Hmg-CoA Reductase Degradation 3</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
Hsp	Hitzeschockprotein
Htm1	auch Mnl1, <i>Mannosidase-like protein</i>
IB	Immunoblot
IgG	Immunglobulin G



---

IP	Immunopräzipitation
Ire1	<i>Inositol requiring 1</i>
Kan	Kanamycin
Kar2	<i>Karyogamy</i>
kb	Kilobasen (1 kb = 1000 bp)
KHN	Fusionsprotein aus der Signalsequenz von Kar2 und der Ectodomäne der HA-Neuraminidase des Affenvirus 5
KWW	Fusionsprotein aus der luminalen Domäne von KHN sowie dem Membrananker und der zytoplasmatischen Domäne von Wsc1
kD/ kDa	Kilodalton (1 kDa = 1000 g/mol)
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
Man	Mannose/ Mannosyl-
MBq	Mega Becquerel
NP40	Nonidet® P40 Substitute
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm
pBPA	<i>p</i> -Benzyol-L-Phenylalanin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
Pdi	Proteindisulfidisomerase
PEG	Polyethylenglykol
Pex	Peroxisome related
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRA*	fehlgefaltete Form der Proteinase A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RING	<i>really interesting new gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>Revolutions per minute</i> )
rv	reverse
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	synthetisches Minimalmedium ( <i>synthetic drop-out</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sec61	<i>Secretory</i>
TBT	Tris-Puffer mit Tween ( <i>Tris buffer with Tween</i> )
TEF	<i>Translation elongation factor 1 alpha</i>
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UBL	<i>Ubiquitin-like domain</i>
Ubx2	<i>Ubiquitin regulatory X 2</i>
Ufd1	<i>Ubiquitin Fusion Degradation protein</i>
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
Usa1	<i>U1-Snp1 Associating 1</i>
V	Volt
v/v	Mischung im Verhältnis Volumen zu Volumen
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
w/v	Mischung im Verhältnis Masse zu Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid
Yos9	<i>Yeast OS-9 homolog</i>
YPD	<i>Yeast extract, Peptone, Dextrose</i>

---

## Präsentationen und Konferenzen

- Symposium: *Decoding the Ubiquitin Chain*  
14.-15. Dezember 2014; MDC Berlin
- *Frankfurt Conference on Ubiquitin and Autophagy*  
04.-07. Juli 2016; Goethe Universität Frankfurt)
- EMBO Konferenz *Ubiquitin and SUMO: From molecular mechanisms to system-wide responses*  
15.-19. September 2017; Cavtat/ Kroatien

Kreßner S, Jarosch E, Sommer T: **Functional characterization of Hrd1 – the E3 enzyme of the HRD-Ligase complex.** (Posterpräsentation)

- 3rd International Symposium: *Membrane and Modules 2018*  
05.- 08. September 2018, Freie Universität Berlin

Kreßner S, Abel T, Jarosch E, Sommer T: **ERAD: How to transport proteins across the ER Membrane.** (Posterpräsentation)

---

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmittel und Hilfen angefertigt habe. Ich habe die Grundsätze der Humboldt-Universität zu Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis umgesetzt und eingehalten. Die Dissertation wurde nicht in Zusammenarbeit mit gewerblichen Promotionsberatern erstellt und auch nicht bereits bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt.

Ich besitze noch keinen entsprechenden Doktorgrad und habe mich nicht anderwärts um einen solchen Titel beworben.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin habe ich zur Kenntnis genommen.

Berlin, 01.04.2019

Susanne Fichtner

---

## *Curriculum Vitae*

Für die elektronische Veröffentlichung entfernt.

---

---

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Prof. Thomas Sommer für seine Unterstützung und die Möglichkeit meine Dissertation in seinem Labor anzufertigen. Ein großes Dankeschön gilt Dr. Ernst Jarosch für die wissenschaftliche Betreuung und die zahlreichen Diskussionen. Beiden danke ich für ihren Optimismus hinsichtlich meiner Arbeit auch in schwierigeren Zeiten.

Den Doktorandinnen und Doktoranden der Arbeitsgruppe Sommer danke ich für ihre Toleranz und die lockere Arbeitsatmosphäre. Auch die gegenseitige Hilfsbereitschaft und die offenen Gespräche verdienen eine Anerkennung.

Ich danke den technischen Angestellten der Arbeitsgruppe für die vielen kleinen und großen Dinge die sie übernahmen und mir damit den Laboralltag erleichterten.

Der größte Dank gilt meiner Familie. Ihr ward die stärkste Motivation um nicht aufzugeben. Diese Arbeit ist für euch.